

CYTOLOGIA

International Journal of Cytology
Internationale Zeitschrift für Zytologie
Archives Internationales de Cytologie

Edita

a

K. Fujii

Botanicae Prof. Hon.
Imperialis Universitatis Tokyensis

WITH THE COOPERATION OF MANY SPECIALISTS AND THE SUPPORT
OF THE "WADA-KUNKÔKAI" FOUNDATION

UNTER MITWIRKUNG ZAHLREICHER FACHGELEHRTER, MIT UNTERSTÜT-
ZUNG DER „WADA-KUNKÔKAI“ STIFTUNG

AVEC LE CONCOURS DE NOMBREUX SPÉCIALISTES, PAR LES SOINS
DE LA FONDATION «WADA-KUNKÔKAI»

Fujii Jubilaei Volumen

pp. 1-640 (Pars I)
(Junius 1937)

TOKYO
1937

CONTENTS INHALT MATIÈRES

(CYTOLOGIA, FUJII JUB. VOL. PARS I.)

	Paginae
Küster, E., Zur Teratologie der Plastiden	1 - 8
Heilborn, O., Notes on Chromosome Associations	9 - 13
Tahara, M., Contributions to the Morphology of <i>Sciadopitys verticillata</i> . .	14 - 19
Matsuura, H., Chromosome Studies on <i>Trillium kamtschaticum</i> Pall. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. (With 2 Plates) .	20 - 34
Keller, R., Elektrische Ladungen des gesunden und kranken Cytoplasmas. .	35 - 42
Beadle, G. W., Chromosome Aberration and Gene Mutation in Sticky Chromosome Plants of <i>Zea mays</i>	43 - 56
Nakamura, M., Cyto-genetical Studies in the Genus <i>Solanum</i> . I. Autopolyploidy of <i>Solanum nigrum</i> Linn. (With 1 Plate)	57 - 68
Bank, O., Umkehrbare Entmischung der Kernkolloide nach Vitalfärbung und Plasmolyse	69 - 77
Goldschmidt, R., A Gynandromorph in <i>Drosophila</i> Produced by Double Fertilization	78 - 79
Satô, D., Karyotype Alteration and Phylogeny, I. Analysis of karyotypes in Aloinae with special reference to the SAT-chromosomes	80 - 95
Jensen, H. W., Meiosis in Several Species of Dioecious Monocotyledoneae I. The possibility of sex-chromosomes	96 - 103
Kiesel, A. and Doinikowa, H., Beitrag zur Kenntnis der Nuclealreaktion in Pflanzen	104 - 107
Sax, K., Chromosome Inversions in <i>Paeonia suffruticosa</i> . (With 1 Plate) .	108 - 114
Sakamura, T., Eine schematische Darstellung der osmotischen Arbeitsleistung und Zustandsgrößen der Pflanzenzelle.	115 - 124
Kikkawa, H., The Inert Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> Doleschall. .	125 - 128
Kaho, H., Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Protoplasmas.	129 - 148
Swezy, O., Alterations in Somatic Chromosomes in <i>Crepis</i>	149 - 155
Vlès, F., Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides dans l'ultra-violet éloigné, et le comportement des cellules dans l'excitation par les courtes longueurs d'onde. (Avec 1 planche)	156 - 158
Takamine, N., Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother cells in <i>Hosta Sieboldiana</i> Engl. (With 1 Plate)	159 - 161
Tischler, G., Die Halligenflora der Nordsee im Lichte cytologischer Forschung	162 - 170
Flory, W. S., Chromosome Numbers in the Polemoniaceae	171 - 180
Yamamoto, Y., Beitrag zum Intersexualitätsproblem bei <i>Aucuba japonica</i> Thunb.	181 - 187
Babcock, E. B., Stebbins, G. L. Jr., and Jenkins, J. A., Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidinae	188 - 210
Müntzing, A., Polyploidy From Twin Seedlings	211 - 227
Moriwaki, D., Abnormal Inheritance in Relation to the "bobbed" Character of <i>Drosophila ananassae</i>	228 - 233
Pringsheim, E. G., Über das Stigma bei farblosen Flagellaten	234 - 255
Shimakura, K., The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mother-cells of <i>Trillium kamtschaticum</i> Pall. Mounted with Saccharose Solution. (With 1 Plate)	256 - 261
Kostoff, D., Cytological Studies on Certain Progenies of the Hybrid <i>Triticum Timopheevi</i> × <i>Triticum persicum</i>	262 - 277
Lewitsky, G. A., Bildung des Kapillitiums bei <i>Fuligo varians</i> . (Mit 1 Tafel). .	278 - 281
Nakajima, G., Cytological Studies in Some Dioecious Plants	282 - 292
Matsumura, S., Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rückkreuzung <i>T. polonicum</i> × (<i>T. polonicum</i> × <i>T. spelta</i>)	293 - 298
Upcott, M., Timing Unbalance at Meiosis in the Pollen-sterile <i>Lathyrus odoratus</i>	299 - 310
Lindenbein, W., Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas in Pflanzenzellen. (Mit 2 Tafeln)	311 - 320
Majumdar, G. P. and Datta, R. M., The Behaviour of the Nucleolus in the Pollen Mother Cells of Certain Members of <i>Nymphaeaceae</i> . (With 1 Plate). .	321 - 322
Morita, J., On the Vital Staining of the Cytoplasmic Granules	323 - 328
Némec, B., Über Kapsel- und Samenbildung bei <i>Lilium candidum</i>	329 - 332

	Paginae
Suzuki, K. , Appearance of Brown Mutants in X-ray Progenies of <i>Homoeogryllus japonicus</i> de Haan	333-335
Thompson, W. P. and Thompson, M. G. , Reciprocal Chromosome Translocations Without Semi-sterility	336-342
Sokolow, N. N. , Untersuchung von Chromosomenabschnitten, die eine Aberration erlitten haben	343-359
Nakai, T. and Momose, S. , A Morphological and Taxonomical Study on Japanese <i>Microlepidia</i>	360-365
Catcheside, D. G. , Secondary Pairing in <i>Brassica oleracea</i>	366-378
Martens, P. , La genèse des "conidies" d'origine ascosporelle chez <i>Aleuria violacea</i>	379-388
Kuwada, Y. , The Hydration and Dehydration Phenomena in Mitosis	389-402
Toshioka, S. , On the Chromosomes of Some Hemipterous Insects	403-406
Schürhoff, P. N. und Müller, H. , Zytologische Untersuchungen über die Haploidgeneration der Apocynaceen. (Mit 1 Tafel)	407-415
Shimamura, T. , On the Spermatozoid of <i>Ginkgo biloba</i> . (With 2 Plates)	416-423
Hirsch, G. C. und Bretschneider, L. H. , Die Arbeitsräume in den Darmzellen von <i>Ascaris</i> ; die Einwirkung des Hungerns; die Sekretbildung	424-436
U, N., Nagamatu, T. and Midusima, U. , A Report on Meiosis in the Two Hybrids, <i>Brassica alba</i> Rabh. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂ and <i>Eruca sativa</i> Lam. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂	437-441
Weber, F. , Über die Anthocyanophoren von <i>Erythraea</i> . (Mit 1 Tafel)	442-446
Eichhorn, A. , Etude caryologique du <i>Carica Papaya</i>	447-448
Shinke, N. , An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei in the Resting Stage. (With 2 Plates)	449-463
Shigenaga, M. , An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells. (With 2 Plates)	464-478
Fischer, A. , Über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum von Gewebekulturen	479-481
Nakamura, T. , Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections. (With 1 Plate)	482-493
Allen, C. E. , Fertility and Compatibility in <i>Sphaerocarpos</i>	494-501
Herrmann, H. und Singer, L. , Zur gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Pflanzenblättern	502-507
Yuasa, A. , Studies in the Cytology of Pteridophyta, XII. Spermatoteleosis in <i>Isoetes japonica</i> Al. Br.	508-513
Mather, K. , The Determination of Position in Crossing-over. II. The chromosome length-chiasma frequency relation	514-526
Okabe, S. , Triploidie in <i>Saxifraga stolonifera</i> Meerb. und <i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i> Kitam.	527-534
Ono, H. , Intergeneric Hybridisation in Cichorieae, III. Fertility and chromosome variations in F ₁ and F ₂ progeny of <i>Paraixeris denticulata</i> and <i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i>	535-539
Just, E. E. , The Significance of Experimental Parthenogenesis for the Cell-biology of To-day	540-550
Shimotomai, N. , Über eine triploide Pflanze von <i>Chrysanthemum</i>	551-552
Ruttle, M. L. and Nebel, B. R. , Chromosome Structure XI. <i>Hordeum vulgare</i> L. and <i>Secale cereale</i> L.	553-568
Kojima, H. , On the Influence of Oxygen Supply upon the Division and Elongation of Cells in the Root	569-575
Chamberlain, C. J. , Alternation of Generation	576-582
Yamane, J. , Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. III. Polysperme Befruchtung der Eizelle und mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle bei der künstlichen Besamung <i>in vitro</i> . (Mit 2 Tafeln)	583-605
Olmo, H. P. , Chromosome Numbers in the European Grape (<i>Vitis vinifera</i>).	606-613
Metz, C. W. , A Note on Salivary Chromosome Knots in Relation to Problems of Mutation and Chromosome Structure	614-616
Yamaha, G. , Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen einiger Pflanzen. (Mit 1 Tafel)	617-626
Bryden, W. , Some Observations upon the Mitotic and Meiotic Divisions in the Wistar Rat. IV. Effect of factors influencing the functional development of the male gonad	627-632
de Mol, W. E. , D'un hybride d'espèces de <i>Narcissus</i> et de sa mutation somatique à la duplication du nombre des chromosomes et des nucléoles	633-640

CONTENTS INHALT MATIÈRES

(CYTOLOGIA, FUJII JUB. VOL. PARS I.)

	Paginae
Küster, E., Zur Teratologie der Plastiden	1-8
Heilborn, O., Notes on Chromosome Associations	9-13
Tahara, M., Contributions to the Morphology of <i>Sciadopitys verticillata</i> . .	14-19
Matsuura, H., Chromosome Studies on <i>Trillium kamschaticum</i> Pall. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. (With 2 Plates) .	20-34
Keller, R., Elektrische Ladungen des gesunden und kranken Cytoplasmas .	35-42
Beadle, G. W., Chromosome Aberration and Gene Mutation in Sticky Chromosome Plants of <i>Zea mays</i>	43-56
Nakamura, M., Cyto-genetical Studies in the Genus <i>Solanum</i> . I. Auto- polyploidy of <i>Solanum nigrum</i> Linn. (With one Plate)	57-68
Bank, O., Umkehrbare Entmischung der Kernkolloide nach Vitalfärbung und Plasmolyse	69-77
Goldschmidt, R., A Gynandromorph in <i>Drosophila</i> Produced by Double Fertilization	78-79
Satô, D., Karyotype Alteration and Phylogeny, I. Analysis of karyotypes in Aloinae with special reference to the SAT-chromosomes	80-95
Jensen, H. W., Meiosis in Several Species of Dioecious Monocotyledoneae I. The possibility of sex-chromosomes	96-103
Kiesel, A. und Doinikowa, H., Beitrag zur Kenntnis der Nuclealreaktion in Pflanzen	104-107
Sax, K., Chromosome Inversions in <i>Paeonia suffruticosa</i> . (With one Plate). Sakamura, T., Eine schematische Darstellung der osmotischen Arbeits- leistung und Zustandsgrößen der Pflanzenzelle	108-114
Kikkawa, H., The Inert Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> Doleschall. Kaho, H., Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Proto- plasmas	115-124
Swezy, O., Alterations in Somatic Chromosomes in <i>Crepis</i>	125-128
Viès, F., Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides dans l'ultra-violet éloigné, et le comportement des cellules dans l'excitation par les courtes longueurs d'onde. (Avec 1 planche)	129-148
Takamine, N., Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother Cells in <i>Hosta Sieboldiana</i> Engl. (With one Plate)	149-155
Tischler, G., Die Halligenflora der Nordsee im Lichte cytologischer For- schung	156-158
Flory, W. S., Chromosome Numbers in the Polemoniaceae	159-161
Yamamoto, Y., Beitrag zum Intersexualitätsproblem bei <i>Aucuba japonica</i> Thunb.	162-170
Babcock, E. B., Stebbins, G. L. Jr., and Jenkins, J. A., Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidinae	171-180
Müntzing, A., Polyploidy From Twin Seedlings	181-187
Moriwaki, D., Abnormal Inheritance in Relation to the "bobbed" Charac- ter of <i>Drosophila ananassae</i>	188-210
Pringsheim, E. G., Über das Stigma bei farblosen Flagellaten	211-227
Shimakura, K., The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mother- cells of <i>Trillium kamschaticum</i> Pall. Mounted with Saccharose Solu- tion. (With one Plate)	228-233
Kostoff, D., Cytological Studies on Certain Progenies of the Hybrid <i>Tri- ticum Timopheevi</i> × <i>Triticum persicum</i>	234-255
Lewitsky, G. A., Bildung des Kapillitiums bei <i>Fuligo varians</i> . (Mit 1 Tafel). Nakajima, G., Cytological Studies in Some Dioecious Plants	256-261
Matsumura, S., Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rück- kreuzung <i>T. polonicum</i> × (<i>T. polonicum</i> × <i>T. spelta</i>)	262-277
Upcott, M., Timing Unbalance at Meiosis in the Pollen-sterile <i>Lathyrus odoratus</i>	278-281
Lindenbein, W., Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Proto- plasmas in Pflanzenzellen. (Mit 2 Tafeln)	282-292
Majumdar, G. P. and Datta, R. M., The Behaviour of the Nucleolus in the Pollen Mother Cells of Certain Members of <i>Nymphaeaceae</i> . (With one Plate)	293-298
Morita, J., On the Vital Staining of the Cytoplasmic Granules	299-310
Némec, B., Über Kapsel- und Samenbildung bei <i>Lilium candidum</i>	311-320
	321-322
	323-328
	329-332

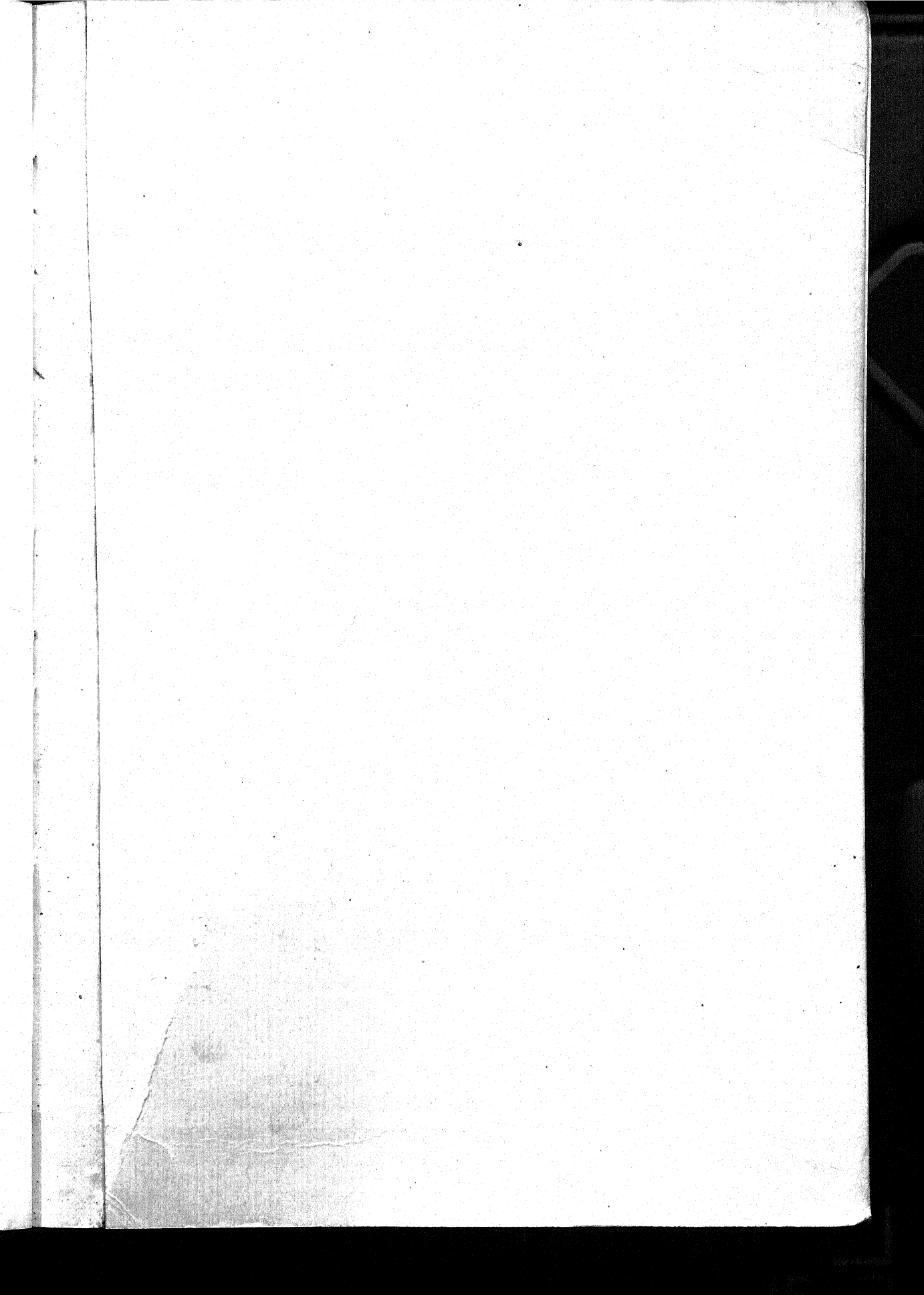
	Paginae
Suzuki, K., Appearance of Brown Mutants in X-ray Progenies of <i>Homoeogryllus japonicus</i> de Haan	333-335
Thompson, W. P. and Thompson, M. G., Reciprocal Chromosome Translocations Without Semi-sterility	336-342
Sokolow, N. N., Untersuchung von Chromosomenabschnitten, die eine Aberration erlitten haben	343-359
Nakai, T. and Momose, S., A Morphological and Taxonomical Study on Japanese <i>Microlepidia</i>	360-365
Catcheside, D. G., Secondary Pairing in <i>Brassica oleracea</i>	366-378
Martens, P., La genèse des "conidies" d'origine ascosporelle chez <i>Aleuria violacea</i>	379-388
Kuwada, Y., The Hydration and Dehydration Phenomena in Mitosis	389-402
Toshioka, S., On the Chromosomes of Some Hemipterous Insects	403-406
Schürhoff, P. N. und Müller, H., Zytologische Untersuchungen über die Haploidgeneration der Apocynaceen. (Mit 1 Tafel)	407-415
Shimamura, T., On the Spermatozoid of <i>Ginkgo biloba</i> . (With 2 Plates)	416-423
Hirsch, G. C. und Bretschneider, L. H., Die Arbeitsräume in den Darmzellen von <i>Ascaris</i> ; die Einwirkung des Hungerns; die Sekretbildung	424-436
U, N., Nagamatsu, T. and Midusima, U., A Report on Meiosis in the Two Hybrids, <i>Brassica alba</i> Rabh. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂ and <i>Eruca sativa</i> Lam. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂	437-441
Weber, F., Über die Anthocyanophoren von <i>Erythraea</i> . (Mit 1 Tafel)	442-446
Eichhorn, A., Etude caryologique du <i>Carica Papaya</i>	447-448
Shinke, N., An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei in the Resting Stage. (With 2 Plates)	449-463
Shigenaga, M., An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells. (With 2 Plates)	464-478
Fischer, A., Über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum von Gewebekulturen	479-481
Nakamura, T., Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections. (With one Plate)	482-493
Allen, C. E., Fertility and Compatibility in <i>Sphaerocarpos</i>	494-501
Herrmann, H. und Singer, L., Zur gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Pflanzenblättern	502-507
Yuasa, A., Studies in the Cytology of Pteridophyta, XII. Spermatoteleosis in <i>Isoetes japonica</i> Al. Br.	508-513
Mather, K., The Determination of Position in Crossing-over. II. The chromosome length-chiasma frequency relation	514-526
Okabe, S., Triploidie in <i>Saxifraga stolonifera</i> Meerb. und <i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i> Kitam.	527-534
Ono, H., Intergeneric Hybridisation in Cichorieae, III. Fertility and chromosome variations in F ₁ and F ₂ progeny of <i>Paraxeris denticulata</i> and <i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i>	535-539
Just, E. E., The Significance of Experimental Parthenogenesis for the Cellbiology of To-day	540-550
Shimotomai, N., Über eine triploide Pflanze von <i>Chrysanthemum</i>	551-552
Ruttle, M. L. and Nebel, B. R., Chromosome Structure XI. <i>Hordeum vulgare</i> L. and <i>Secale cereale</i> L.	553-568
Kojima, H., On the Influence of Oxygen Supply upon the Division and Elongation of Cells in the Root	569-575
Chamberlain, C. J., Alternation of Generation	576-582
Yamane, J., Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. III. Polysperme Befruchtung der Eizelle und mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle bei der künstlichen Besamung <i>in vitro</i> . (Mit 2 Tafeln)	583-605
Olmo, H. P., Chromosome Numbers in the European Grape (<i>Vitis vinifera</i>).	606-613
Metz, C. W., A Note on Salivary Chromosome Knots in Relation to Problems of Mutation and Chromosome Structure	614-616
Yamaha, G., Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen einiger Pflanzen. (Mit 1 Tafel)	617-626
Bryden, W., Some Observations upon the Mitotic and Meiotic Divisions in the Wistar Rat. IV. Effect of factors influencing the functional development of the male gonad	627-632
de Mol, W. E., D'un hybride d'espèces de <i>Narcissus</i> et de sa mutation somatique à la duplication du nombre des chromosomes et des nucléoles	633-640

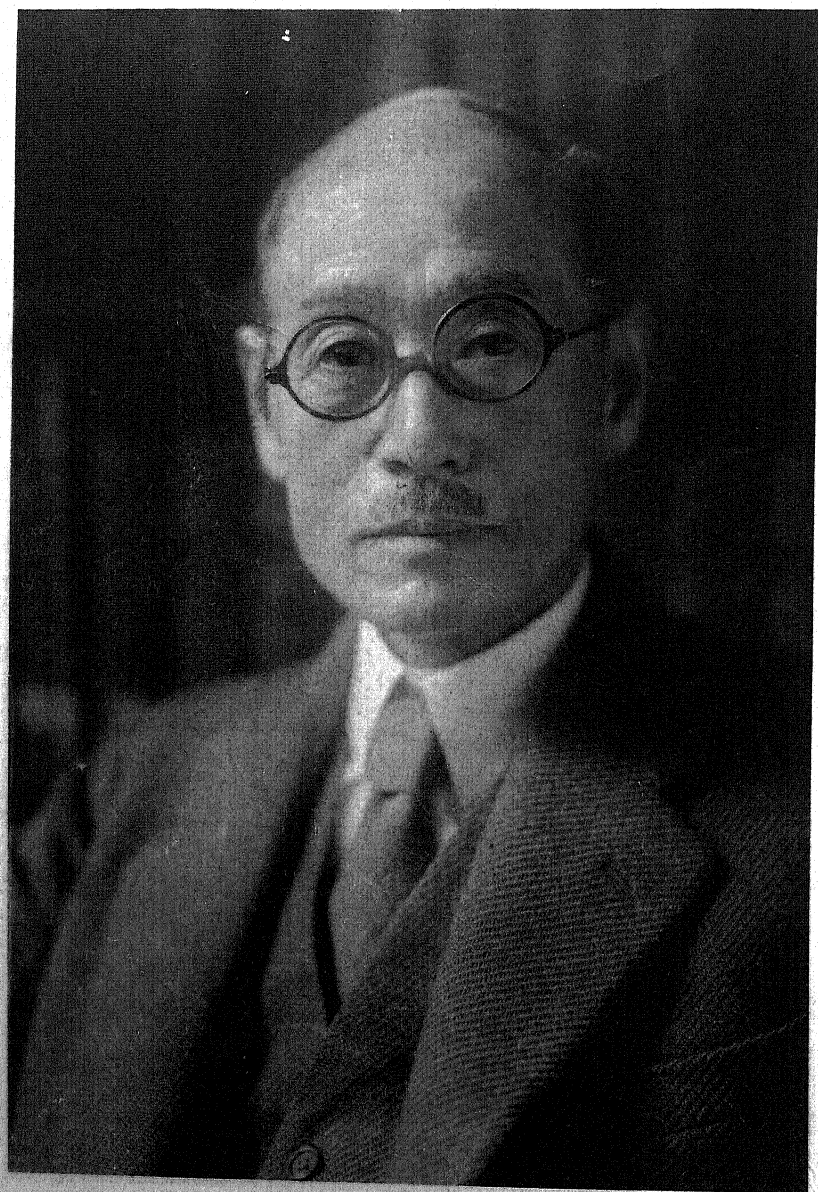
INDEX

(CYTOLOGIA, FUJII JUB. VOL. PARS I.)

	Paginae
Allen, C. E., Fertility and Compatibility in <i>Sphaerocarpos</i>	494-501
Babcock, E. B., Stebbins, G. L. Jr. and Jenkins, J. A., Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidinae	188-210
Bank, O., Umkehrbare Entmischung der Kernkolloid nach Vitalfärbung und Plasmolyse	69-77
Beadle, G. W., Chromosome Aberration and Gene Mutation in Sticky Chromosome Plants of <i>Zea mays</i>	43-56
Bryden, W., Some Observations upon the Mitotic and Meiotic Divisions in the Wistar Rat. IV. Effect of factors influencing the functional development of the male gonad	627-632
Catcheside, D. G., Secondary Pairing in <i>Brassica oleracea</i>	366-378
Chamberlain, C. J., Alteration of Generation	576-582
Eichhorn, A., Etude caryologique du <i>Carica Papaya</i>	447-448
Fischer, A., Über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum von Gewebekulturen.	479-481
Flory, W. S., Chromosome Numbers in the Polemoniaceae	171-180
Goldschmit, R., A Gynandromorph in <i>Drosophila</i> Produced by Double Fertilization	78-79
Heilborn, O., Notes on Chromosome Associations	9-13
Herrmann, H. and Singer, L., Zur gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Pflanzenblättern	502-507
Hirsch, G. C. und Bretschneider, L. H., Die Arbeitsräume in den Darmzellen von <i>Ascaris</i> ; die Einwirkung des Hungerns; die Sekretbildung	424-436
Jensen, H. W., Meiosis in Several Species of Dioecious Monocotyledoneae I. The possibility of sex-chromosomes	96-103
Just, E. E., The Significance of Experimental Parthenogenesis for the Cell-biology of To-day	540-550
Kaho, H., Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität der Protoplasmas	129-148
Keller, B., Elektrische Ladungen des gesunden und kranken Cytoplasmas.	35-42
Kiesel, A. and Doinikowa, H., Beitrag zur Kenntnis der Nuclealreaktion in Pflanzen	104-107
Kikkawa, H., The Inert Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> Doleschall.	125-128
Kojima, H., On the Influence of Oxygen Supply upon the Division and Elongation of Cells in the Root	569-575
Kostoff, D., Cytological Studies on Certain Progenies of the Hybrid <i>Triticum Timopheevi</i> × <i>Triticum persicum</i>	262-277
Küster, E., Zur Teratologie der Plastiden	1-8
Kuwada, Y., The Hydration and Dehydration Phenomena in Mitosis	389-402
Lewitsky, G. A., Bildung des Kapillitiums bei <i>Fuligo varians</i> . (Mit 1 Tafel).	278-281
Lindenbein, W., Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas in Pflanzenzellen. (Mit 2 Tafeln).	311-320
Majumdar, G. P. and Datta, R. M., The Behaviour of the Nucleus in the Pollen Mother Cells of Certain Members of <i>Nymphaeaceae</i> . (With one Plate)	321-322
Martens, P., La genèse des "conidies" d'origine ascosporelle chez <i>Aleuria violacea</i>	379-388
Mather, K., The Determination of Position in Crossing-over. II. The chromosome length-chiasma frequency relation	514-526
Matsumura, S., Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rückkreuzung <i>T. polonicum</i> × (<i>T. polonicum</i> × <i>T. spelta</i>)	293-298
Matsuura, H., Chromosome Studies on <i>Trillium kamschaticum</i> Pall. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. (With 2 Plates)	20-34
Metz, C. W., A Note on Salivary Chromosome Knots in Relation to Problem of Mutation and Chromosome Structure	614-616
de Mol, W. E., D'un hybride d'espèces de <i>Narcissus</i> et de sa mutation somatique à la duplication du nombre des chromosomes et des nucléoles.	633-640
Morita, J., On the Vital Staining of the Cytoplasmic Granules	323-328
Moriwaki, D., Abnormal Inheritance in Relation to the "bobbed" Character of <i>Drosophila ananassae</i>	228-233
Müntzing, A., Polyploidy From Twin Seedlings	211-227

	Paginae
Nakai, T. and Momose, S., A Morphological and Taxonomical Study on Japanese <i>Microlepia</i>	360-365
Nakajima, G., Cytological Studies in Some Dioecious Plants	282-292
Nakamura, M., Cyto-genetical Studies in the Genus <i>Solanum</i> . I. Autopolyploidy of <i>Solanum nigrum</i> Linn. (With one Plate)	57-68
Nakamura, T., Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections. (With one Plate)	482-493
Némec, B., Über Kapsel- und Samenbildung bei <i>Lilium candidum</i>	329-332
Okabe, S., Triploide in <i>Saxifraga stolonifera</i> Meerb. und <i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i> Kitam.	527-534
Olmo, H. P., Chromosome Numbers in the European Grape (<i>Vitis vinifera</i>).	606-613
Ono, H., Intergenetic Hybridisation in Cichorieae, III. Fertility and chromosome variations in F ₁ and F ₂ progeny of <i>Paraixeris denticulata</i> and <i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i>	535-539
Pringsheim, E. G., Über das Stigma bei farblosen Flagellaten	234-255
Ruttle, M. L. and Nebel, B. R., Chromosome Structure XI. <i>Hordeum vulgare</i> L. and <i>Secale cereale</i> L.	553-568
Sakamura, T., Eine schematische Darstellung der osmotischen Arbeitsleistung und Zustandsgrößen der Pflanzenzelle.	115-124
Satō, D., Karyotype Alteration and Phylogeny, I. Analysis of karyotypes in Aloinae with special reference to the SAT-chromosomes	80-95
Sax, K., Chromosome Inversions in <i>Paeonia suffruticosa</i> . (With one Plate).	108-114
Schürhoff, P. N. und Müller, H., Zytologische Untersuchungen über die Haploidgeneration der Apocynaceen. (Mit 1 Tafel)	407-415
Shigenaga, M., An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells. (With 2 Plates)	464-478
Shimakura, K., The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mother-cells of <i>Trillium kamtschaticum</i> Pall. Mounted with Saccharose Solution. (With one Plate)	256-261
Shimamura, T., On the Spermatozoid of <i>Ginkgo biloba</i> . (With 2 Plates)	416-423
Shimotomai, N., Über eine triploide Pflanze von <i>Chrysanthemum</i>	551-553
Shinke, N., An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei in the Resting Stage. (With 2 Plates)	449-463
Sokolow, N. N., Untersuchung von Chromosomenabschnitten, die eine Aberration erlitten haben	343-359
Suzuki, K., Appearance of Brown Mutants in X-ray Progenies of <i>Homoeogryllus japonicus</i> de Haan.	333-335
Swezy, O., Alterations in Somatic Chromosomes in <i>Crepis</i>	149-155
Tahara, M., Contributions to the Morphology of <i>Sciadopitys verticillata</i>	14-19
Takamine, N., Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother Cells in <i>Hosta Sieboldiana</i> Engl. (With one Plate)	159-161
Thompson, W. P. and Thompson, M. G., Reciprocal Chromosomes Translocations Without Semi-sterility	336-342
Tischler, G., Die Halligenflora der Nordsee im Lichte cytologischer Forschung	162-170
Toshioka, S., On the Chromosomes of Some Hemipterous Insects	403-406
U, N., Nagamatu, T. and Midusima, U., A Report on Meiosis in the Two Hybrids, <i>Brassica alba</i> Rabh. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂ and <i>Eruca sativa</i> Lam. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂	437-441
Upcott, M., Timing Unbalance at Meiosis in the Pollen-sterile <i>Lathyrus odoratus</i>	299-310
Vlès, F., Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides dans l'ultra-violet éloigné, et le comportement des cellules dans l'excitation par les courtes longueurs d'onde. (Avec 1 planche)	156-158
Weber, F., Über die Anthocyanophoren von <i>Erythraea</i> . (Mit 1 Tafel)	442-446
Yamaha, G., Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen einiger Pflanzen. (Mit 1 Tafel)	617-626
Yamamoto, Y., Beitrag zum Intersexualitätsproblem bei <i>Aucuba japonica</i> Thunb.	181-187
Yamane, J., Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. III. Polysperme Befruchtung der Eizelle und mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle bei der künstliche Besamung <i>in vitro</i> . (Mit 2 Tafeln)	583-605
Yuasa, A., Studies in the Cytology of Pteridophyta, XII. Spermatoteleosis in <i>Isoetes japonica</i> Al. Br.	508-513





K. Fujita

PROFESSORI KENJIRO FUJII

Tokiensis Imperialis Universitatis Professori Honorario

Cytologiaeque Ephemeridis Editori

In Commemoratione Septuagesimi

Aetatis suae Anni

Die quinto Octobris MCMXXXVI

CONTENTS INHALT MATIÈRES

(CYTOLOGIA, FUJII JUB. VOL.)

	Paginae
Küster, E., Zur Teratologie der Plastiden	1-8
Heilborn, O., Notes on Chromosome Associations	9-13
Tahara, M., Contributions to the Morphology of <i>Sciadopitys verticillata</i> . .	14-19
Matsuura, H., Chromosome Studies on <i>Trillium kamschaticum</i> Pall. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. (With 2 Plates) .	20-34
Keller, R., Elektrische Ladungen des gesunden und kranken Cytoplasmas. .	35-42
Beadle, G. W., Chromosome Aberration and Gene Mutation in Sticky Chromosome Plants of <i>Zea mays</i>	43-56
Nakamura, M., Cyto-genetical Studies in the Genus <i>Solanum</i> . I. Autopolyploidy of <i>Solanum nigrum</i> Linn. (With one Plate).	57-68
Bank, O., Umkehrbare Entmischung der Kernkolloide nach Vitalfärbung und Plasmolyse	69-77
Goldschmidt, R., A Gynandromorph in <i>Drosophila</i> Produced by Double Fertilization	78-79
Satô, D., Karyotype Alteration and Phylogeny, I. Analysis of karyotypes in Aloinae with special reference to the SAT-chromosomes	80-95
Jensen, H. W., Meiosis in Several Species of Dioecious Monocotyledoneae I. The possibility of sex-chromosomes	96-103
Kiesel, A. und Doinikowa, H., Beitrag zur Kenntnis der Nuclealreaktion in Pflanzen	104-107
Sax, K., Chromosome Inversions in <i>Paeonia suffruticosa</i> . (With one Plate). .	108-114
Sakamura, T., Eine schematische Darstellung der osmotischen Arbeitsleistung und Zustandsgrößen der Pflanzenzelle.	115-124
Kikkawa, H., The Inert Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> Doleschall. .	125-128
Kaho, H., Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Protoplasmas.	129-148
Swezy, O., Alterations in Somatic Chromosomes in <i>Crepis</i>	149-155
Vlès, F., Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides dans l'ultra-violet éloigné, et le comportement des cellules dans l'excitation par les courtes longueurs d'onde. (Avec 1 planche)	156-158
Takamine, N., Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother Cells in <i>Hosta Sieboldiana</i> Engl. (With one Plate).	159-161
Tischler, G., Die Halligenflora der Nordsee im Lichte cytologischer Forschung	162-170
Flory, W. S., Chromosome Numbers in the Polemoniaceae	171-180
Yamamoto, Y., Beitrag zum Intersexualitätsproblem bei <i>Aucuba japonica</i> Thunb.	181-187
Babcock, E. B., Stebbins, G. L. Jr., and Jenkins, J. A., Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidinae	188-210
Müntzing, A., Polyploidy From Twin Seedlings	211-227
Moriwaki, D., Abnormal Inheritance in Relation to the "bobbed" Character of <i>Drosophila ananassae</i>	228-233
Pringsheim, E. G., Über das Stigma bei farblosen Flagellaten	234-255
Shimakura, K., The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mother-cells of <i>Trillium kamschaticum</i> Pall. Mounted with Saccharose Solution. (With one Plate)	256-261
Kostoff, D., Cytological Studies on Certain Progenies of the Hybrid <i>Triticum Timopheevi</i> × <i>Triticum persicum</i>	262-277
Lewitsky, G. A., Bildung des Kapillitiums bei <i>Fuligo varians</i> . (Mit 1 Tafel). .	278-281
Nakajima, G., Cytological Studies in Some Dioecious Plants	282-292
Matsumura, S., Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rückkreuzung <i>T. polonicum</i> × (<i>T. polonicum</i> × <i>T. spelta</i>).	293-298
Upcott, M., Timing Unbalance at Meiosis in the Pollen-sterile <i>Lathyrus odoratus</i>	299-310
Lindenhein, W., Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas in Pflanzenzellen. (Mit 2 Tafeln).	311-320
Majumdar, G. P. and Datta, R. M., The Behaviour of the Nucleolus in the Pollen Mother Cells of Certain Members of <i>Nymphaeaceae</i> . (With one Plate)	321-322
Morita, J., On the Vital Staining of the Cytoplasmic Granules	323-328
Némec, B., Über Kapsel- und Samenbildung bei <i>Lilium candidum</i>	329-332

	Paginae
Suzuki, K., Appearance of Brown Mutants in X-ray Progenies of <i>Homoeogryllus japonicus</i> de Haan	333-335
Thompson, W. P. and Thompson, M. G., Reciprocal Chromosome Translocations Without Semi-sterility	336-342
Sokolow, N. N., Untersuchung von Chromosomenabschnitten, die eine Aberration erlitten haben	343-359
Nakai, T. and Momose, S., A Morphological and Taxonomical Study on Japanese <i>Microlepidia</i>	360-365
Catcheside, D. G., Secondary Pairing in <i>Brassica oleracea</i>	366-378
Martens, P., La genèse des "conidies" d'origine ascosporelle chez <i>Aleuria violacea</i>	379-388
Kuwada, Y., The Hydration and Dehydration Phenomena in Mitosis	389-402
Toshioka, S., On the Chromosomes of Some Hemipterous Insects	403-406
Schürhoff, P. N. und Müller, H., Zytologische Untersuchungen über die Haploidgeneration der Apocynaceen. (Mit 1 Tafel)	407-415
Shimamura, T., On the Spermatozoid of <i>Ginkgo biloba</i> . (With 2 Plates)	416-423
Hirsch, G. C. und Bretschneider, L. H., Die Arbeitsräume in den Darmzellen von <i>Ascaris</i> ; die Einwirkung des Hungerns; die Sekretbildung	424-436
U, N., Nagamatu, T. and Midusima, U., A Report on Meiosis in the Two Hybrids, <i>Brassica alba</i> Rabh. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂ and <i>Eruca sativa</i> Lam. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂	437-441
Weber, F., Über die Anthocyanophoren von <i>Erythraea</i> . (Mit 1 Tafel)	442-446
Eichhorn, A., Etude caryologique du <i>Carica Papaya</i>	447-448
Shinke, N., An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei in the Resting Stage. (With 2 Plates)	449-463
Shigenaga, M., An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells. (With 2 Plates)	464-478
Fischer, A., Über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum von Gewebekulturen	479-481
Nakamura, T., Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections. (With one Plate)	482-493
Allen, C. E., Fertility and Compatibility in <i>Sphaerocarpos</i>	494-501
Herrmann, H. und Singer, L., Zur gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Pflanzenblättern	502-507
Yuasa, A., Studies in the Cytology of Pteridophyta, XII. Spermatoteleosis in <i>Isoetes japonica</i> Al. Br.	508-513
Mather, K., The Determination of Position in Crossing-over. II. The chromosome length-chiasma frequency relation	514-526
Okabe, S., Triploidie in <i>Saxifraga stolonifera</i> Meerb. und <i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i> Kitam.	527-534
Ono, H., Intergeneric Hybridisation in Cichorieae, III. Fertility and chromosome variations in F ₁ and F ₂ progeny of <i>Paraixeris denticulata</i> and <i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i>	535-539
Just, E. E., The Significance of Experimental Parthenogenesis for the Cellbiology of To-day	540-550
Shimotomai, N., Über eine triploide Pflanze von <i>Chrysanthemum</i>	551-552
Ruttle, M. L. and Nebel, B. R., Chromosome Structure XI. <i>Hordeum vulgare</i> L. and <i>Secale cereale</i> L.	553-568
Kojima, H., On the Influence of Oxygen Supply upon the Division and Elongation of Cells in the Root	569-575
Chamberlain, C. J., Alternation of Generation	576-582
Yamane, J., Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. III. Polysperme Befruchtung der Eizelle und mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle bei der künstlichen Besamung <i>in vitro</i> . (Mit 2 Tafeln)	583-605
Olmo, H. P., Chromosome Numbers in the European Grape (<i>Vitis vinifera</i>).	606-613
Metz, C. W., A Note on Salivary Chromosome Knots in Relation to Problems of Mutation and Chromosome Structure	614-616
Yamaha, G., Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen einiger Pflanzen. (Mit 1 Tafel)	617-626
Bryden, W., Some Observations upon the Mitotic and Meiotic Divisions in the Wistar Rat. IV. Effect of factors influencing the functional development of the male gonad	627-632
de Mol, W. E., D'un hybride d'espèces de <i>Narcissus</i> et de sa mutation somatique à la duplication du nombre des chromosomes et des nucléoles	633-640

	Paginae
Daniel, J. F., The Living Egg-Cell of <i>Triturus torosus</i>	641 - 643
Renner, O., Zur Kenntnis der Plastiden- und Plasmavererbung.	644 - 653
Kihara, H. and Nishiyama, I., Possibility of Crossing-over between Semi-homologous Chromosomes from Two Different Genoms	654 - 666
Pätau, K., SAT-Chromosom und Spiralstruktur der Chromosomen der extrakapsulären Körper (<i>Merodinium spec.</i>) von <i>Collozoum inermis</i> Müller.	667 - 680
Haga, T., Karyotypic Polymorphism in <i>Paris hexaphylla</i> Cham., with Special Reference to Its Origin and to the Meiotic Chromosome Behavior.	681 - 700
Pfeiffer, H., Experimental Researches on the Non-Newtonian Nature of Protoplasm	701 - 710
Morgan, T. H., The Factors Locating the First Cleavage Plane in the Egg of <i>Chaetopterus</i>	711 - 732
Kagawa, F., Chromosomal Chimeras and Polyploidy in <i>Solanum gracile</i> Link	733 - 744
Bridges, C. B., Correspondences Between Linkage Maps and Salivary Chromosome Structure, as Illustrated in the Tip of Chromosome 2R of <i>Drosophila melanogaster</i>	745 - 755
Chandler, C., Porterfield, W. M. and Stout, A. B., Microsporogenesis in Diploid and Triploid Types of <i>Lilium tigrinum</i> with Special References to Abortions. (With 3 Plates)	756 - 784
Wada, B., Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. V. Die Einwirkung des Ammonia-Dampfes auf die Mitose bei den Staubfadenhaarzellen von <i>Tradescantia reflexa</i> . (Mit 2 Tafeln)	785 - 795
Oguma, K., Absence of the Y-Chromosome in the Vole, <i>Microtus montebelli</i> Edw. with Supplementary Remarks on the Sex chromosomes of <i>Eutamias</i> and <i>Apodemus</i> . (With one Plate)	796 - 808
Guilliermond, A., Sur la coloration vitale des vacuoles par le rouge neutre dans les cellules du protonema de " <i>Polytrichum commune</i> "	809 - 813
Tanaka, N., Chromosome Studies in Cyperaceae, I	814 - 821
Santos, J. K., Macrosporogenesis of <i>Lilium philippinense</i> Baker. (With one Plate)	822 - 835
Teunissen, R. J. H., Strukturelle Veränderungen im Gewebe der Stoffwechselzellen des „Fettkörpers“ von <i>Calliphora</i> während des Umbaus der Puppe. Vorläufige Mitteilung.	836 - 844
Sugiura, T., Studies on the Chromosome Numbers in Higher Plants, with Special Reference to Cytokinesis, II	845 - 849
Kusunoki, S., Untersuchungen über die Geschlechtszellen von <i>Spirogonium sticticum</i> Kütz. (Mit 1 Tafel)	850 - 856
Jeffrey, E. C., The Somatic Chromosomes of <i>Trillium</i>	857 - 866
Makino, S., The Chromosomes of Two Elasmobranch Fishes	867 - 876
Dodge, B. D., Spindle Orientation and Spore Delimitation in <i>Gelasinospora tetrasperma</i> . (With 2 Plates)	877 - 887
Ikeno, S., Zur Kenntnis des Erbverhaltens einer gynodiözischen Pflanze, <i>Petasites japonicus</i> Miq.	888 - 896
Okuno, S., Karyological Studies on Some Species of <i>Lobelia</i>	897 - 902
Lehmann, E., Die Gattung <i>Veronica</i> in entwicklungsgeschichtlicher Betrachtung	903 - 919
Suita, N., Studies on the Male Gametophyte in Angiosperms, II. Differentiation and behaviour of the vegetative and generative elements in the pollen grains of <i>Crinum</i> . (With one Plate)	920 - 933
Imai, Y., The Behaviour of the Plastid as a Hereditary Unit: The Theory of the Plastogene	934 - 947
Moritz, O. und Rohn, H. L., Zur Frage der serologischen Differenzierbarkeit biologischer Rassen	948 - 960
Goodspeed, T. H., Significance of Cytogenetic Alterations Induced by High Frequency Radiation in <i>Nicotiana</i> Species	961 - 966
Morinaga, T. and Kuriyama, H., On the Autopolyploids of the Rape	967 - 969
Miduno, T., Zytologische Untersuchungen der Bryophyten, III. Die Morphologie des Spermatozoids von <i>Reboulia hemisphaerica</i>	970 - 976

	Paginae
Gates, R. R. , The Discovery of the Relation Between the Nucleolus and the Chromosomes	977-986
Winiwarter, H. de , Les chromosomes du genre <i>Gryllotalpa gryll.</i> L. . .	987-994
Takenaka, Y. , On the Special Autosomes with Reference to the Sex-determination of <i>Rumex acetosa</i> , L.	995-1002
Tschermak-Seysenegg, E. , Wirkliche, abgeleitete und fragliche Weizenroggenbastarde (Triticale-Formen)	1003-1011
Sakisaka, M. , Notes on the Anatomy of Variegated Leaves. (With one Plate)	1012-1014
Huskins, C. L. , The Internal Structure of Chromosomes-A Statement of Opinion. (With 2 Plates)	1015-1022
Kawaguchi, E. , Chromosomenketten beim Rassenbastarde des Seidenspinners <i>Philosamia cynthia</i> . (Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. III). (Mit 1 Tafel)	1023-1032
Ohga, I. , On the Fertilization of <i>Nelumbo nucifera</i> . (With one Plate). .	1033-1035
Kamiya, N. , Untersuchungen über die Wirkung des elektrischen Stromes auf lebende Zellen. I. Das Verhalten der mitotischen Figur unter der Wirkung des Gleichstromes	1036-1042
Kaufmann, B. P. , Morphology of the Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> . (With one Plate)	1043-1055
Satō, M. , Chromosome Variation in the Progeny of Triploid <i>Lilium tigrinum</i>	1056-1061
Yamashita, K. , Über eine diplo-tetraploide Chimäre bei <i>Triticum</i> . (Mit 2 Tafeln)	1062-1069
Blakeslee, A. F., Bergner, A. D. and Avery, A. G. , Geographical Distribution of Chromosomal Prime Types in <i>Datura stramonium</i>	1070-1093
Wóycicki, Z. , L'aspect et nombre des chromosomes méiotiques chez <i>Sweetia perennis</i>	1094-1100
Yasui, K. , Cytogenetic Studies in Artificially Raised Interspecific Hybrids of <i>Papaver</i> . VI. The trigenomic hybrids of <i>Papaver</i> . (With 2 Plates). .	1101-1112
Becker, W. A. , Über das sogenannte Schrittwachstum der Zelle	1113-1124
Demerec, M. , Relationship Between Various Chromosomal Changes in <i>Drosophila melanogaster</i>	1125-1132
Sato, T. und Tamiya, H. , Über die Atmungsfarbstoffe von <i>Paramecium</i> . .	1133-1138
Sinotō, Y. , Karyotype Analysis in the F ₁ Hybrids of Cristate and Normal Forms of <i>Rumex acetosa</i>	1139-1146

INDEX

(CYTOLOGIA, FUJII JUB. VOL.)

	Paginae
Allen, C. E., Fertility and Compatibility in <i>Sphaerocarpos</i>	494 - 501
Babcock, E. B., Stebbins, G. L. Jr. and Jenkins, J. A., Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidinae	188 - 210
Bank, O., Umkehrbare Entmischung der Kernkolloide nach Vitalfärbung und Plasmolyse	69 - 77
Beadle, G. W., Chromosome Aberration and Gene Mutation in Sticky Chromosome Plants of <i>Zea mays</i>	43 - 56
Becker, W. A., Über das sogenannte Schrittwachstum der Zelle	1113-1124
Blakeslee, A. F., Bergner, A. D. and Avery, A. G., Geographical Distribution of Chromosomal Prime Types in <i>Datura stramonium</i>	1070-1093
Bridges, C. B., Correspondence Between Linkage Maps and Salivary Chromosome Structure, as Illustrated in the Tip of Chromosome 2R of <i>Drosophila melanogaster</i>	745 - 755
Bryden, W., Some Observations upon the Mitotic and Meiotic Divisions in the Wistar Rat. IV. Effect of factors influencing the functional development of the male gonad	627 - 632
Catcheside, D. G., Secondary Pairing in <i>Brassica oleracea</i>	366 - 378
Chamberlain, C. J., Alternation of Generation	576 - 582
Chandler, C., Porterfield, W. M. and Stout, A. B., Microsporogenesis in Diploid and Triploid Types of <i>Lilium tigrinum</i> with Special References to Abortions. (With 3 Plates)	756 - 784
Daniel, J. F., The Living Egg-Cell of <i>Triturus torosus</i>	641 - 643
Demerec, M., Relationship Between Various Chromosomal Changes in <i>Drosophila melanogaster</i>	1125-1132
Dodge, B. D., Spindle Orientation and Spore Delimitation in <i>Gelasinospora tetrasperma</i> . (With 2 Plates)	877 - 887
Eichhorn, A., Etude caryologique du <i>Carica Papaya</i>	447 - 448
Fischer, A., Über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum von Gewebekulturen	479 - 481
Flory, W. S., Chromosome Numbers in the Polemoniaceae	171 - 180
Gates, R. R., The Discovery of the Relation Between the Nucleolus and the Chromosomes	977 - 986
Goldschmidt, R., A Gynandromorph in <i>Drosophila</i> Produced by Double Fertilization	78 - 79
Goodspeed, T. H., Significance of Cytogenetic Alterations Induced by High Frequency Radiation in <i>Nicotiana</i> Species	961 - 966
Guilliermond, A., Sur la coloration vitale des vacuoles par le rouge neutre dans les cellules du protonema de " <i>Polytrichum commune</i> "	809 - 813
Haga, T., Karyotypic Polymorphism in <i>Paris hexaphylla</i> Cham., with Special Reference to Its Origin and to the Meiotic Chromosome Behavior.	681 - 700
Heilborn, O., Notes on Chromosome Associations	9 - 13
Herrmann, H. und Singer, L., Zur gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Pflanzenblättern	502 - 507
Hirsch, G. C. und Bretschneider, L. H., Die Arbeitsräume in den Darmzellen von <i>Ascaris</i> ; die Einwirkung des Hungerns; die Sekretbildung.	424 - 436
Huskins, C. L., The Internal Structure of Chromosomes—A Statement of Opinion. (With 2 Plates)	1015-1022
Ikeno, S., Zur Kenntnis des Erbverhaltens einer gynodiözischen Pflanze, <i>Petasites japonicus</i> Miq.	888 - 896
Imai, Y., The Behaviour of the Plastid as a Hereditary Unit: The Theory of the Plastogene	934 - 947
Jeffrey, E. C., The Somatic Chromosomes of <i>Trillium</i>	857 - 866
Jensen, H. W., Meiosis in Several Species of Dioecious Monocotyledoneae I. The possibility of sex-chromosomes.	96 - 103

	Paginae
Just, E. E., The Significance of Experimental Parthenogenesis for the Cell-biology of To-day	540 - 550
Kagawa, F., Chromosomal Chimeras and Polyploidy in <i>Solanum gracile</i> Link	733 - 744
Kaho, H., Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Protoplasmas	129 - 148
Kamiya, N., Untersuchungen über die Wirkung des elektrischen Stromes auf lebende Zellen. I. Das Verhalten der mitotischen Figur unter der Wirkung des Gleichstromes	1036-1042
Kaufmann, B. P., Morphology of the Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> . (With one Plate)	1043-1055
Kawaguchi, E., Chromosomenketten beim Rassenbastarde des Seidenspinners <i>Philosamia cynthia</i> . (Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. III). (Mit 1 Tafel)	1023-1032
Keller, R., Elektrische Ladungen des gesunden und kranken Cytoplasmas.	35 - 42
Kiesel, A. und Donikowa, H., Beitrag zur Kenntnis der Nuclealreaktion in Pflanzen	104 - 107
Kihara, H. and Nishiyama, I., Possibility of Crossing-over between Semi-homologous Chromosomes from Two Different Genoms	654 - 666
Kikkawa, H., The Inert Chromosomes of <i>Drosophila ananassae</i> Doleschall.	125 - 128
Kojima, H., On the Influence of Oxygen Supply upon the Division and Elongation of Cells in the Root	569 - 575
Kostoff, D., Cytological Studies on Certain Progenies of the Hybrid <i>Triticum Timopheevi</i> × <i>Triticum persicum</i>	262 - 277
Küster, E., Zur Teratologie der Plastiden	1 - 8
Kusunoki, S., Untersuchungen über die Geschlechtszellen von <i>Spirogonium sticticum</i> Kutz. (Mit 1 Tafel)	850 - 856
Kuwada, Y., The Hydration and Dehydration Phenomena in Mitosis	389 - 402
Lehmann, E., Die Gattung <i>Veronica</i> in entwicklungsgeschichtlicher Betrachtung	903 - 919
Lewitsky, G. A., Bildung des Kapillitiums bei <i>Fuligo varians</i> . (Mit 1 Tafel).	278 - 281
Lindenbein, W., Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas in Pflanzenzellen. (Mit 2 Tafeln)	311 - 320
Majumdar, G. P. and Datta, R. M., The Behaviour of the Nucleolus in the Pollen Mother Cells of Certain Members of <i>Nymphaeaceae</i> . (With one Plate)	321 - 322
Makino, S., The Chromosomes of Two Elasmobranch Fishes	867 - 876
Martens, P., La genèse des "conidies" d'origine ascoporelle chez <i>Aleuria violacea</i>	379 - 388
Mather, K., The Determination of Position in Crossing-over. II. The chromosome length-chiasma frequency relation	514 - 526
Matsumura, S., Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rückkreuzung <i>T. polonicum</i> × (<i>T. polonicum</i> × <i>T. spelta</i>)	293 - 298
Matsuura, H., Chromosome Studies on <i>Trillium kamtschaticum</i> Pall. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. (With 2 Plates).	20 - 34
Metz, C. W., A Note on Salivary Chromosome Knots in Relation to Problems of Mutation and Chromosome Structure	614 - 616
Miduno, T., Zytologische Untersuchungen der Bryophyten, III. Die Morphologie des Spermatozoids von <i>Reboulia hemisphaerica</i>	970 - 976
de Mol, W. E., D'un hybride d'espèces de <i>Narcissus</i> et de sa mutation somatique à la duplication du nombre des chromosomes et des nucléoles.	633 - 640
Morgan, T. H., The Factor Locating the First Cleavage Plane in the Egg of <i>Chaetopterus</i>	711 - 732
Morinaga, T. and Kuriyama, H., On the Autopolyploids of the Rape	967 - 969
Morita, J., On the Vital Staining of the Cytoplasmic Granules	323 - 328
Moritz, O. und Rohn, H. L., Zur Frage der serologischen Differenzierbarkeit biologischer Rassen	948 - 960
Moriwaki, D., Abnormal Inheritance in Relation to the "bobbed" Character of <i>Drosophila ananassae</i>	228 - 233
Müntzing, A., Polyploidy From Twin Seedlings.	211 - 272

	Paginae
Nakai, T. and Momose, S., A Morphological and Taxonomical Study on Japanese <i>Microlepia</i>	360 - 365
Nakajima, G., Cytological Studies in Some Dioecious Plants	282 - 292
Nakamura, M., Cyto-genetical Studies in the Genus <i>Solanum</i> . I. Autopolyploidy of <i>Solanum nigrum</i> Linn. (With one Plate).	57 - 68
Nakamura, T., Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections. (With one Plate).	482 - 493
Némec, B., Über Kapsel- und Samenbildung bei <i>Lilium candidum</i>	329 - 332
Oguma, K., Absence of the Y-Chromosome in the Vole, <i>Microtus montebelli</i> Edw. with Supplementary Remarks on the Sex-Chromosomes of <i>Eutamias</i> and <i>Apodemus</i> . (With one Plate).	796 - 808
Ohga, I., On the Fertilization of <i>Nelumbo nucifera</i> . (With one Plate)	1033-1035
Okabe, S., Triploidie in <i>Saxifraga stolonifera</i> Meerb. und <i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i> Kitam.	527 - 534
Okuno, S., Karyological Studies on Some Species of <i>Lobelia</i>	897 - 902
Olmo, H. P., Chromosome Numbers in the European Grape (<i>Vitis vinifera</i>)	606 - 613
Ono, H., Intergeneric Hybridisation in Chichorieae, III. Fertility and chromosome variations in F ₁ and F ₂ progeny of <i>Paraxeris denticulata</i> and <i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i>	535 - 539
Pätau, K., SAT-Chromosom und Spiralstruktur der Chromosomen der extrakapsulären Körper (<i>Merodinium</i> spec.) von <i>Collozoum inermis</i> Müller.	667 - 680
Pfeiffer, H., Experimental Researches on the Non-Newtonian Nature of Protoplasm	701 - 710
Pringsheim, E. G., Über das Stigma bei farblosen Flagellaten	234 - 255
Renner, O., Zur Kenntnis der Plastiden- und Plasmavererbung.	644 - 653
Ruttle, M. L. and Nebel, B. R., Chromosome Structure XI. <i>Hordeum vulgare</i> L. and <i>Secale cereale</i> L.	553 - 568
Sakamura, T., Eine schematische Darstellung der osmotischen Arbeitsleistung und Zustandsgrößen der Pflanzenzelle	115 - 124
Sakisaka, M., Notes on the Anatomy of Variegated Leaves. (With one Plate)	1012-1014
Santos, J. K., Macrosporogenesis of <i>Lilium philippinense</i> Baker. (With one Plate)	822 - 835
Satô, D., Karyotype Alteration and Phylogeny, I. Analysis of karyotypes in Aloinae with special reference to the SAT-chromosomes	80 - 95
Satô, M., Chromosome Variation in the Progeny of Triploid <i>Lilium tigrinum</i>	1056-1061
Sato, T. and Tamiya, H., Über die Atmungsfarbstoffe von <i>Paramecium</i>	1133-1138
Sax, K., Chromosome Inversions in <i>Paeonia suffruticosa</i> . (With one Plate).	108 - 114
Schürhoff, P. N. und Müller, H., Zytologische Untersuchungen über die Haploidgeneration der Apocynaceen. (Mit 1 Tafel)	407 - 415
Shigenaga, M., An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells. (With 2 Plates)	464 - 478
Shimakura, K., The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mothercells of <i>Trillium kamtschaticum</i> Pall. Mounted with Saccharose Solution. (With one Plate)	256 - 261
Shimamura, T., On the Spermatozoid of <i>Ginkgo biloba</i> . (With 2 Plates).	416 - 423
Shimotomai, N., Über eine triploide Pflanze von <i>Chrysanthemum</i>	551 - 552
Shinke, N., An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei in the Resting Stage. (With 2 Plates)	449 - 463
Sinotô, Y., Karyotype Analysis in the F ₁ Hybrids of Cristate and Normal Forms of <i>Rumex acetosa</i>	1139-1146
Sokolow, N. N., Untersuchung von Chromosomenabschnitten, die eine Aberration erlitten haben	343 - 359
Sugiura, T., Studies on the Chromosome Numbers in Higher Plants, with Special Reference to Cytokinesis, II	845 - 849
Suita, N., Studies on the Male Gametophyte in Angiosperms, II. Differentiation and behaviour of the vegetative and generative elements in the pollen grains of <i>Crinum</i> . (With one Plate)	920 - 933

	Paginae
Suzuki, K. , Appearance of Brown Mutants in X-ray Progenies of <i>Homoeogryllus japonicus</i> de Haan	333 - 335
Swezy, O. , Alterations in Somatic Chromosomes in <i>Crepis</i>	149 - 155
Tahara, M. , Contributions to the Morphology of <i>Sciadopitys verticillata</i>	14 - 19
Takamine, N. , Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother Cells in <i>Hosta Sieboldiana</i> Engl. (With one Plate)	159 - 161
Takenaka, Y. , On the Special Autosomes with Reference to the Sex-determination of <i>Rumex acetosa</i> , L.	995-1002
Tanaka, N. , Chromosome Studies in Cyperaceae, I	814 - 821
Teunissen, R. J. H. , Strukturelle Veränderungen im Gewebe der Stoffwechselzellen des „Fettkörper“ von <i>Calliphora</i> während des Umbaus der Puppe. Vorläufige Mitteilung	836 - 844
Thompson, W. P. and Thompson, M. G. , Reciprocal Chromosome Translocations Without Semi-sterility	336 - 342
Tischler, G. , Die Halligenflora der Nordsee im Lichte cytologischer Forschung	162 - 170
Toshioka, S. , On the Chromosomes of Some Hemipterous Insects	403 - 406
Tschermak-Seysenegg, E. , Wirkliche, abgeleitete und fragliche Weizenroggenbastarde (Triticale-Formen)	1003-1011
U, N., Nagamatu, T. and Midusima, U. , A Report on Meiosis in the Two Hybrids, <i>Brassica alba</i> Rabh. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂ and <i>Eruca sativa</i> Lam. ♀ × <i>B. oleracea</i> L. ♂	437 - 441
Upcott, M. , Timing Unbalance at Meiosis in the Pollen-sterile <i>Lathyrus odoratus</i>	299 - 310
Viés, F. , Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides dans l'ultra-violet éloigné, et le comportement des cellules dans l'excitation par les courtes longueurs d'onde. (Avec 1 planche).	156 - 158
Wada, B. , Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. V. Die Einwirkung des Ammonia-Dampfes auf die Mitose bei den Staubfadenhaarzellen von <i>Tradescantia reflexa</i> . (Mit 2 Tafeln)	785 - 795
Weber, F. , Über die Anthocyanophoren von <i>Erythraea</i> . (Mit 1 Tafel)	442 - 446
de Winiwarter, H. , Les chromosomes du genre <i>Gryllotalpa gryll.</i> L.	987 - 994
Wóycicki, Z. , L'aspect et nombre des chromosomes méiotiques chez <i>Sveertia perennis</i>	1094-1100
Yamaha, G. , Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen einiger Pflanzen. (Mit 1 Tafel)	617 - 626
Yamamoto, Y. , Beitrag zum Intersexualitätsproblem bei <i>Aucuba japonica</i> Thunb.	181 - 187
Yamane, J. , Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. III. Polysperme Befruchtung der Eizelle und mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle bei der künstlichen Besamung <i>in vitro</i> . (Mit 2 Tafeln)	583 - 605
Yamashita, K. , Über eine diplo-tetraploide Chimäre bei <i>Triticum</i> . (Mit 2 Tafeln)	1062-1069
Yasui, K. , Cytogenetic Studies in Artificially Raised Interspecific Hybrids of <i>Papaver</i> . VI. The trigenomic hybrids of <i>Papaver</i> . (With 2 Plates).	1102-1112
Yuasa, A. , Studies in the Cytology of Pteridophyta, XII. Spermatoteleosis in <i>Isoetes japonica</i> Al. Br.	503 - 513

Zur Teratologie der Plastiden

Von

Ernst Küster, Gießen

(Mit 9 Abbildungen im Text)

Bei vielen einzelligen und vielzelligen Algen—vielen Diatomeen, Braunalgen usw.—haben die Plastiden sehr wechselvolle, oft von Zelle zu Zelle sich ändernde Formen; bei vielen anderen Algen ebenso wie bei den Bryophyten, Pterido- und Spermatophyten ist die Form der Plastiden konstant und wohlgezeichnet,—in hervorragendem Maße bei vielen Konjugaten, manchen Grünalgen u.a.m.

Von einer Teratologie der Plastiden wird man nur bei denjenigen Organismen sprechen können, bei welchen hinsichtlich der Formung der Farbstoffträger der zweite Fall verwirklicht ist, und alle Zellen, die wir als normale zu betrachten Anlaß haben, mit Plastiden der gleichen Form ausgestattet sind. Diejenigen Abweichungen von den normalen Formen werden wir bei ihnen als teratologisch zu bezeichnen geneigt sein, bei welchem die sonst wirk-samen Gesetze ihrer Gestaltung nicht mehr maßgebend geblieben sind, andererseits aber die Struktur und die physiologische Leistungs-fähigkeit mit den normalen übereinstimmen.

In der Literatur sind bereits wiederholt Befunde beschrieben worden, die wir nach dem Gesagten als teratologische einzuschätzen uns entschließen werden.

Es gibt Fälle, in welchen die Farbstoffträger in ihrer Form durchaus abhängig sind von der der Zelle, und jede Formen-abweichung der letzteren eine entsprechende der Plastiden veranlaßt. So ist es begreiflich, daß jede „teratologische“ Formenabweichung der Zellen von *Mesocarpus* ebensolche Anomalien ihrer Plastiden nach sich zieht (vgl. KÜSTER 1935, 243). Wir übergehen diese Gruppe der Plastidenterata und wollen nach solchen suchen, deren Zustandekommen durch andere Faktoren bestimmt wird.

Ausführlich hat sich KASANOWSKY (1913) mit dem Phänomen der Verzweigung beschäftigt, das er an den Chlorophyllbändern von *Spirogyra* beobachtet hat. Eine solche Abweichung vom normalen Formenbefund bedeutet zwar eine auffallende Anomalie; indessen könnte man einwenden, daß gerade die von KASANOWSKY beobachtete Verzweigung nicht durchaus als teratologisch bewertet werden muß, da durch sie der Übergang von einbändigen zu zweibändigen Zellen

vermittelt wird, und die Ausstattung der Zellen mit zwei Bändern mit demselben Rechte als normal zu bezeichnen ist, wie solche mit nur einem Bande. Indessen hat sich zeigen lassen (vgl. KÜSTER 1927), daß an den Chloroplasten derselben Alge Verzweigungen auftreten können, die recht wohl als teratologische Bildungen wirken — ich meine diejenigen, die an bogig deformierten, in der Nähe des Zellenendes zurückgekrümmten Schraubenbändern erscheinen und gelegentlich zur Bildung so ungewöhnlicher Formen wie geschlossener Chloroplastenringe führen können. In allen Fällen bleibt gleichwohl die Beschaffenheit der Farbstoffbänder durchaus normal.

Weitere Mißformen, die den Zellenteratologen interessieren, sind von *Bryopsis* bekannt (KÜSTER 1927). In alternden Kulturen begegnet man nicht selten *Bryopsis*-Fäden, deren Chloroplasten abnorm lang geworden sind: ihr Wachstum hat auch unter den abnormen Bedingungen der Kultur seine Fortsetzung gefunden; aber ihre Teilung ist ausgeblieben. Im Allgemeinen liegen diese sehr langen Chloroplastenbänder genau in der Richtung der Längsachse des Zellschlauches; gelegentlich aber treten Verlagerungen ein, die Chloroplasten biegen sich und falten sich unter dem Einfluß der Protoplasmaströmung schließlich zu hufeisen- oder magnetähnlichen Formen zusammen. Solche Schlingen sind garnicht selten anzutreffen, und auf ihre Entstehung führe ich es zurück, wenn neben normalen gelegentlich sehr auffällige dreischenkellige Plastidenformen sichtbar werden, d.h. solche, an welchen aus dem konvexen Scheitelpunkte des Hufeisens ein neuer Plastidenzweig herausgewachsen ist. Wie bei der vorhin erläuterten *Spirogyra* kann man auch hier von einer Verzweigung der Plastiden sprechen und bei beiden Objekten übereinstimmend feststellen, daß eine solche Verzweigung oftmals an gekrümmten Plastiden eintritt und an der konvexen Flanke einen Seitenast entstehen kann.

Je komplizierter die Form eines Plastiden wird, umso leichter dürften teratologische Mißformen an ihnen dem Mikroskopiker auffallen. Solche Erwägungen veranlaßten mich schon vor geraumer Zeit, den Zellen und Plastiden von *Zygnema* meine Aufmerksamkeit zu schenken. Bekanntlich sind die Chloroplasten dieser Gattung zu je zwei in jeder Zelle zu finden; sie sind groß und sternartig verzweigt; ihre tentakel- oder pseudopodienähnlich gebildeten Fortsätze reichen bis an die Wand und können sich an dieser umbiegen oder fußartig verbreitern.

Ich habe unter wechselnden Bedingungen verschiedene *Zygnema*-Arten kultiviert und vermochte sie auch in Teichwasser im Laboratorium zu befriedigendem Wachstum zu bringen (vgl. CZURDA 1932). Anomalien in der Ausbildung der Plastiden sind mir aber bei Durch-

sicht meiner Kulturen niemals aufgefallen, solange die Zellen in normalem Grünen begriffen waren. Gelegentliche Zerstückelungen der Plastiden, mögen zunächst außer Acht bleiben, da es fraglich ist, ob es sich bei jenen Fällen immer um völlig normal funktionierende Zellen und Plastiden gehandelt haben mag; wir kommen später noch auf diese Erscheinungen zurück.

Ein einfaches Mittel, die Form der Plastiden weitgehend zu beeinflussen, fand ich in der Methode der Schleuderung. Schon geringe Fliehkräfte ($r = 11$ cm; Zahl der Umdrehungen 1200 i.d. Minute; Behandlung der Objekte 10 Minuten lang) reichen aus, den Inhalt der Zellen zu verlagern und namentlich auch die seit WISSELINGH (1909, 1921—vgl. auch KÜSTER 1932) wohlbekannten Zellteilungsanomalien hervorzurufen: Wenn es zur rechten Zeit gelingt, den Zellkern und die Plastiden einer unmittelbar vor der Teilung stehenden Zelle zu verlagern, ohne die Teilung der Zelle selbst zu stören, so gewinnt man eine kern- und plastidenfreie Tochterzelle neben einer anderen, welche den ganzen Kern- und Plastidenvorrat der Mutterzelle erbt. Auch die kernlosen Zellen erweisen sich als lebensfähig und fallen zuweilen durch die mit vielen Gerbstoffbläschen ausgestatteten rundlichen Plasmaanhäufungen auf, die sich überall an der zylindrischen Wand der inhaltsarmen Zelle finden (Fig. 1 und 3).

Viel häufiger als kernlose Zellen entstehen kernlose Kammern: Die Querwandbildung bleibt unvollkommen, und die Mutterzelle wird in eine kernlose und plastidenfreie Kammer und eine andere mit allen Organellen ausgestattete zerlegt, und beide Kammern bleiben dauernd miteinander in plasmatischer Verbindung.

Die Plastiden der mit der Zentrifuge behandelten Fäden verdienen in mehr als einer Beziehung unsere Aufmerksamkeit. Nicht nur in den nach der Schleuderbehandlung abnorm geteilten Zellen, (Fig. 1–4), sondern auch in denjenigen, welche keine abnorme Teilung erfahren haben, treten allerhand Anomalien an den Plastiden auf; irgendwelche Korrelationen, die in den normalen Zellen walten und Zellengröße und Plastidengröße und Plastidenzahl regulierend bestimmen, sind durch das Zentrifugenexperiment gestört worden, und solche Störungen machen sich auch lange nach der Rückverlagerung des geschleuderten Zellinhaltes und nach wiederholten Teilungen der behandelten Zellen immer noch geltend; die Plastiden mit ihren reich gegliederten Formen scheinen diese hypothetischen Störungen eines korrelativ festgelegten Gleichgewichtes für uns am ehesten wahrnehmbar zu machen.

Diejenigen Zellen, die erst geraume Zeit—Tage und Wochen—nach der Schleuderbehandlung entstanden sind, lassen die Wirkungen

des Eingriffes zuweilen besonders mannigfaltig an ihren Plastiden erkennen, und gerade an ihnen finden sich überraschende Beiträge zum Kapitel der Plastidenteratologie.

Die uns beschäftigende Wirkung des Zentrifugeneingriffes ist übrigens immer nur an einigen Fäden jeder Versuchsprobe zu beobachten; welche Bedingungen das Reaktionsvermögen der Zellen bestimmen, läßt sich nicht angeben. Die in anderen Zusammenhängen gewonnenen Erfahrungen der experimentellen Zytologie machen es sehr wahrscheinlich, daß dieselben Korrelationsstörungen,

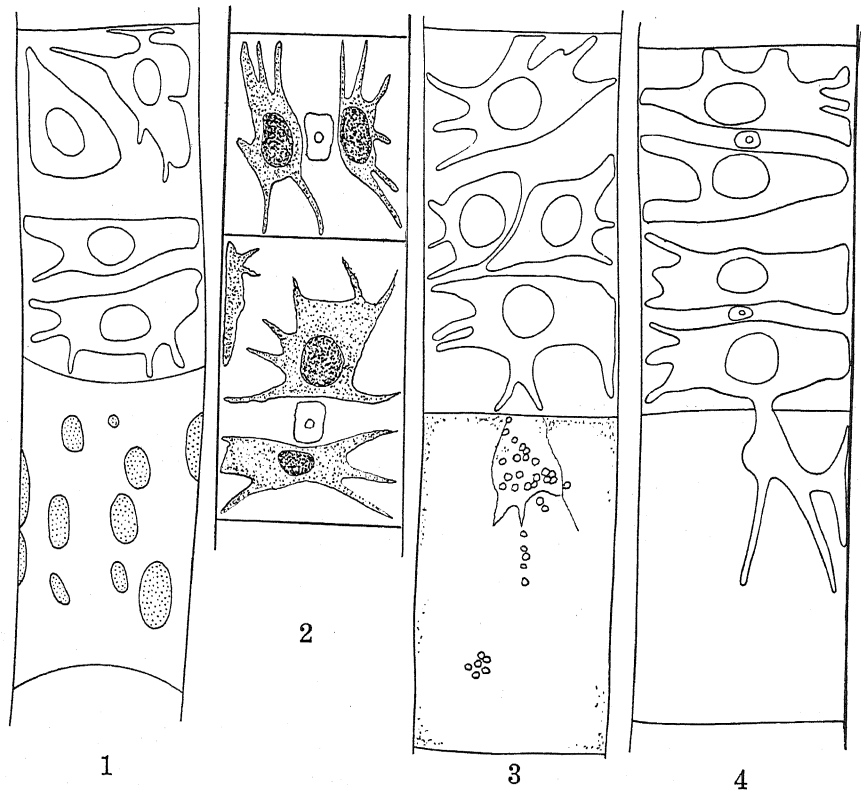
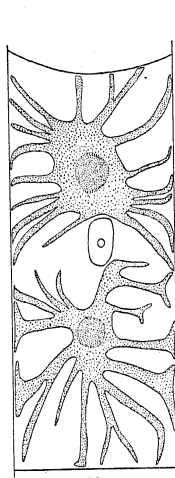


Fig. 1. Inäquale Teilung einer zentrifugierten Zelle. Eine mit 4 Plastiden ausgestattete Zelle liegt neben einer plastidenfreien; diagonale Grenzfläche der beiden oberen Plastiden; in der inhaltsarmen unteren Zelle zahlreiche systrophische Protoplasmahäufungen, die mit vielen Gerbstoffbläschen ausgestattet sind. Fig. 2. Entstehung von 2 plastidenhaltigen Tochterzellen; in der unteren liegt neben zwei großen ein dritter kleiner Chloroplast; abnorme Lagerung der Plastiden in der oberen Zelle. An die gezeichneten beiden Zellen grenzt oben und unten je eine mit zwei normalen Plastiden ausgestattete besonders große (ungeteilt gebliebene) Zelle. Fig. 3. Abnorme Lagerung der Plastiden in der distalen Zelle; in der inhaltsarmen proximalen liegt eine stattliche systrophische Plasmahäufung. Fig. 4. Einer der 4 Plastiden, die in der doppelkernigen distalen Zelle liegen, hat sich durch ein Foramen der Querwand in die proximale inhaltsarme Kammer der unvollkommen geteilten Zelle entwickelt.

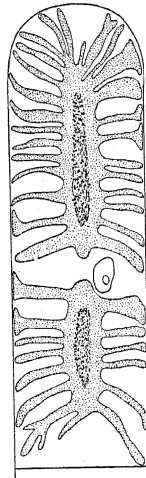
die wir in unserem Falle auf die Schleuderbehandlung zurückführen, sich auch durch andere Eingriffe in das Zellenleben hervorrufen lassen werden. Wir kommen am Schlusse unserer Betrachtungen noch einmal auf die Frage nach den Ursachen der beobachteten Erscheinungen kurz zurück.

Es fällt an den Plastiden vieler Zellen auf, daß sie besonders groß werden und sich reicher verzweigen als in den übrigen Fäden derselben Kulturen. Starke Verbreiterung der Pseudopodien an denjenigen Stellen, an welchen sie die Wand erreichen, ist häufig zu beobachten, ebenso sind kräftige Verzweigungen der Pseudopodien oder ihre segelartige Verbreiterung nicht selten; die Form der Plastiden erfährt eine Streckung in der Längsachse der Zelle (vgl. Fig. 5). Wieweit solche Veränderungen gehen können, wird zuwei-

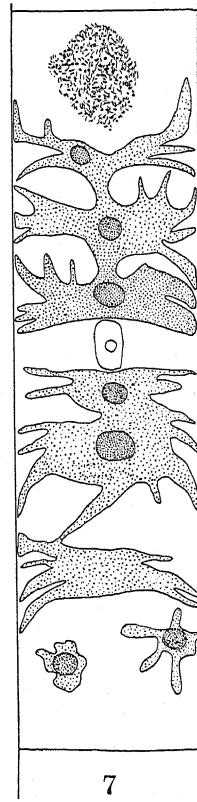
len an den Endzellen der Fäden deutlich (vgl. Fig. 6): Während in künstlichen Kulturen oftmals Fäden ange-
troffen werden, deren Zellen sich abnorm verlängert haben, ohne daß die Plastidenfüllung mit Zellenwachstum gleichen Schritt gehalten hätte, so daß die Pseudopodien der Plastiden nicht mehr die Querwände erreichen, und beide Enden der Zellen farblos bleiben, ge-
währen Zellen wie die in Fig. 6 dargestellte den Eindruck, daß das fortgesetzte Wachstum der Zellen durchaus assimila-



5



6



7

Fig. 5. Üppige Entwicklung der Plastiden nach Zentrifugenbehandlung. Fig. 6. Endzelle eines zentrifugierten Fadens; luxurierendes Wachstum der Plastiden, sehr reichliche Pseudopodienbildung. Fig. 7. Stockwerkbau der Plastiden; an einem Ende der Zelle selbständig gewordene Teilstücke der Plastiden, am anderen ein Haufen von kristallinen Niederschlägen (nach lebendem Material gezeichnet—wie alle Figuren).

tiven Charakter behalten hat und von einer starken Vermehrung der Plastidensubstanz begleitet geblieben ist, Kern- und Zellteilung aber ausgeblieben sind. Das luxurierende Wachstum der Plastiden führt zu absonderlich dicht verzweigten, langzylindrischen Formen, die durch ihr

hohes Maß von Gliederung wohl alles in Schatten stellen, was für Chloroplasten bisher bekannt ist.

Garnicht selten sind die Fälle, in welchen die hypertrophisch heranwachsenden Plastiden eine periodische Struktur annehmen. Alle denkbaren Zwischenformen zwischen Plastiden, an welchen manche Pseudopodien sich am Ende keulen- oder plattenartig verbreitern und von ihrem Ende aus ihrerseits Systeme von Pseudopodien entwickeln, und andererseits solchen, bei welchen Folgen übereinander gelagerter Plastidenmassen zustandekommen, sind in den Kulturen zu finden. Zuweilen entstehen höchst regelmäßig aufgebaute Stockwerkplastiden: man findet 2 oder 3 reich verzweigte Plastidenkörper, von welchen jeder sein Pyrenoid enthält, die aber durch kräftige Isthmusstücke miteinander verbunden bleiben (Fig. 7 oben); oder die Anteile sind ungleich groß, ihre Verbindungsstücke von wechselnder Länge und Dicke (Fig. 7 unten). Diese vertizillaten Plastiden sind der Ausdruck für innere Bedingungen, welche zwar keine Kern- und Zellteilung anregen oder zulassen, aber wenigstens eine unvollkommene Teilung der Plastiden ermöglichen.

Die Teilung der Plastiden bleibt nicht immer unvollständig. Ich habe stockwerkartig aufgebaute Plastiden beobachtet, deren Teilkörper nur durch sehr dünne Stränge miteinander verbunden waren, und in noch anderen Fällen einzelne große oder kleine Teile sich selbstständig machen sehen (Fig. 7 unten). Kleine Teilstücke finden ihren Platz an der Außenwand der Zelle und liegen ihr als sternförmig gelappte Scheiben an—Plastidenformen, die von zahlreichen Diatomeen, Rotalgen usw. her bekannt sind; von SCHERRER (1915) werden bereits *Zygnema*-Plastiden beschrieben, die ihre Pseudopodien nicht im Raume, sondern in einer Ebene entwickeln. Fig. 8 zeigt unten links eine ansehnlich große pseudopodial verzweigte Plastidenplatte, deren Substanz sich zu einer überaus dünnen Lamelle ausgebreitet hat. Schließlich kommen Konfigurationen der Plastidensubstanz zustande, wie sie Fig. 9 zeigt: acht ungleich große, verschieden geformte, durchweg wandständige Plastiden sind hier sichtbar; auch bei solchen Befunden handelt es sich offenbar um Plastiden und überhaupt um Zellen von normaler funktionstüchtiger Beschaffenheit.

Mit der soeben beschriebenen Erscheinung der Plastidenzersplitterung haben wir Formenanomalien beschrieben, die in der Literatur bereits mehrfach für *Zygnema* behandelt worden sind; SCHERRER (1915) sah in *Zygnemazellen* die Chloroplasten in 6 und 7 Stücke zerfallen und erwähnt, daß solche Erscheinungen wohl durch die ungünstigen Wachstumsbedingungen veranlaßt worden waren, unter welchen sein Material sich entwickelt hatte; ich selbst

(1916, 271) habe *Zygnemazellen* beschrieben, die mehrere Wintermonate hindurch in Kultur gehalten waren, und welche neben den beiden großen typischen Plastiden mehrere kleine, meist wandständige enthielten.

„Zersplitterungen“ der Plastidensubstanz sind bereits für zahlreiche Objekte beschrieben worden; die Vorgänge sind im allgemeinen auf kapillare Kontraktion zurückzuführen und physikalisch ohne weiteres verständlich; die Zerfallerscheinungen der *Zygnema*-Plastiden sind jedoch mit jenen kapillar bedingten Phänomenen der Abrundung nicht ohne weiteres zu identifizieren, so lange an den Teilstücken der normalen *Zygnema*-Chloroplasten starke Ausbreitung und Pseudopodienbildung (vgl. Fig. 8 und namentlich SCHERRER's *Zygnema*-Figuren a.a.O. Taf. III) festzustellen sind.

Die von uns in den vorangehenden Blättern beschriebenen Anomalien, die durch beträchtliche Substanzzunahme des Plastidenapparates und durch seine weitgehende Gliederung gekennzeichnet werden, scheinen bisher nicht beschrieben zu sein.

Sehr schwer ist es, über die Faktoren sich Rechenschaft zu geben, welche die hier uns interessierenden Formanomalien verursachen. Wenn einzelne Pseudopodien durch das Foramen einer unvollkommen gebliebenen Querwand hindurch in eine plastidenfreie Kammer vorwärts wachsen und in ihr sich verbreitern und verzweigen (Fig. 4), so liegt es nahe, die anomalen Raumverhältnisse und—durch diese bedingt—anomale Ernährungsbedingungen für die abnorme Gestaltung der Plastiden verantwortlich zu machen. Für viele andere der beobachteten Fälle wird dieser Erklärungsversuch nicht befriedigen können. Da die Schleuderung der *Zygnema*-Fäden, wie wir gehört haben, zur Bildung doppelkerniger Zellen führen kann, war zu prüfen, ob vielleicht in diploiden Zellen der Plastidenapparat eine so auffallend gesteigerte Entwicklung erfährt; ich konnte mich aber nicht davon überzeugen, daß diese in zweifellos haploiden Zellen unmöglich wäre.—

Ich habe versucht, auch an den Zellen von *Spirogyra* und *Mesocarpus* durch dieselben Angriffe ähnliche Wandlungen der Plastidenformen zu erzielen, bin aber ohne Erfolg geblieben; zu erwähnen

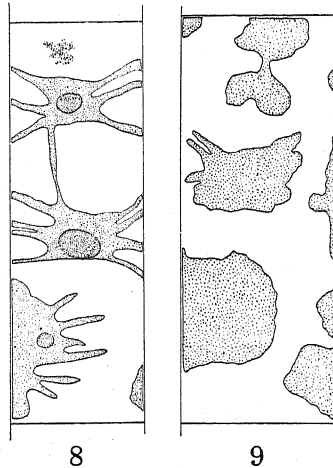


Fig. 8. Anomale Teilung der Plastiden; oben Niederschlagshäufung.
Fig. 9. Zerfall der lebenden Plastiden in wandständige Teilstücke; nur einigen von diesen lassen Pseudopodienbildung erkennen.

sind höchstens die Verzweigungen der Chlorophyllbänder, die mir an geschleuderten *Spirogyrazellen* oftmals aufgefallen sind.

Ich erwähne bei dieser Gelegenheit nur noch die ungewöhnlichen Plastidenformen, die ich bei *Spirogyra* und *Mesocarpus* durch Kultur in einem Medium, dem ich eine geringe Menge Diastase zugesetzt hatte, erzielen konnte. Bei *Mesocarpus* können zuweilen die Plastiden so breit werden, daß sie in eine parietale Stellung genötigt werden und sich zu fast geschlossenen Röhren formen. Bei *Spirogyra*—diese Beobachtungen beziehen sich auf eine schmale einbändige Art mit gefalteten Querwänden—werden die Schraubenbänder stellenweise so breit und entwickeln so mächtige Randzähne, daß sie mit diesen die ganze Breite der Zelle (den halben Zylinderumfang) in Anspruch nehmen, ja sogar über diese Masse noch hinausreichen.

Literatur

- Czurda, V. 1932. Zygnemales (PASCHER's Süßwasserflora Bd. 9, 2. Aufl. Jena).
 Kasanowsky, V. 1913. Die Chlorophyllbänder und Verzweigung derselben bei *Spirogyra Nawaschini* (sp. nov.) (Ber. d. D. Bot. Ges. Bd. 31, 55).
 Küster, E. 1916. Pathologische Pflanzenanatomie 2. Aufl. Jena.
 ——— 1927. Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Chloroplasten (Protoplasma Bd. 2, 65).
 ——— 1932. Protoplasmaabewegungen in zentrifugierten Zellen (Ber. Oberhess. Ges. f. Nat. u. Heilkde. Gießen Bd. 15).
 ——— 1935. Die Pflanzenzelle. Vorlesungen über normale und pathologische Zytomorphologie und Zytogenese. Jena.
 Scherrer, A. 1915. Untersuchungen über Bau und Vermehrung der Chromatophoren und das Vorkommen von Chondriosomen bei *Anthoceros* (Flora Bd. 107, 1).
 Wisselingh, C. V. 1909. Zur Physiologie der *Spirogyrazelle* (Beih. z. Bot. Zbl. Abt. I Bd. 24, 133).
 ——— 1921. Zehnter Beitrag zur Kenntnis der Karyokinese, I, II, III (Beih. z. Bot. Zbl. Abt. I, Bd. 38, 273).

Notes on Chromosome Associations

By
Otto Heilborn
(Stockholm)

I

At meiosis chromosomes conjugate, generally by twos. The force, causing this conjugation, is said to be an *attraction*. Though the real nature of the presumed attraction is unknown, the phenomenon *looks* like an attraction, and as a mere description this terminology may, therefore, be accepted. The bivalents, resulting from conjugation, are very often dispersed over the metaphase and anaphase plates in such a way as to form distinct groups of two, three or, sometimes, more chromosomes. The last-mentioned phenomenon has been described as "*secondary attraction*", "*secondary pairing*", or "*secondary association*". This terminology has been introduced by DARLINGTON and his collaborators, and has been widely accepted. Unfortunately, however, it is not purely descriptive but involves various theoretical interpretations the influence of which upon research work has not been fortunate. It is, therefore, in need of revision to a certain degree.

The word "secondary" involves the assumption that the phenomenon is a secondary effect of the same force that causes meiotic conjugation. However, as the writer has recently tried to show (HEILBORN 1936), so-called "secondary association" is not confined to the meiotic phase but occurs in various kinds of nuclei. It is, therefore, not secondary but a primary and general characteristic of all nuclei. In a similar way, the words "attraction" and "pairing" involve assumptions: 1) The phenomenon is an attraction, i.e. caused by the same force as that acting during meiotic conjugation; 2) The phenomenon is a pairing, i.e. strictly comparable to meiotic conjugation. All these assumptions are mere conjectures, based upon an incomplete analysis of a material (apples, *Dahlia*) that has not been well suited for an analysis.

The use of a proper terminology is very important in scientific discussions. In the present case, a single phenomenon has been alternately given three different names. Furthermore, all of these involve theoretical assumptions instead of being purely descriptive: they are not names, they are hypotheses! On account of this, the terminology has prevented an unprejudiced interpretation of the

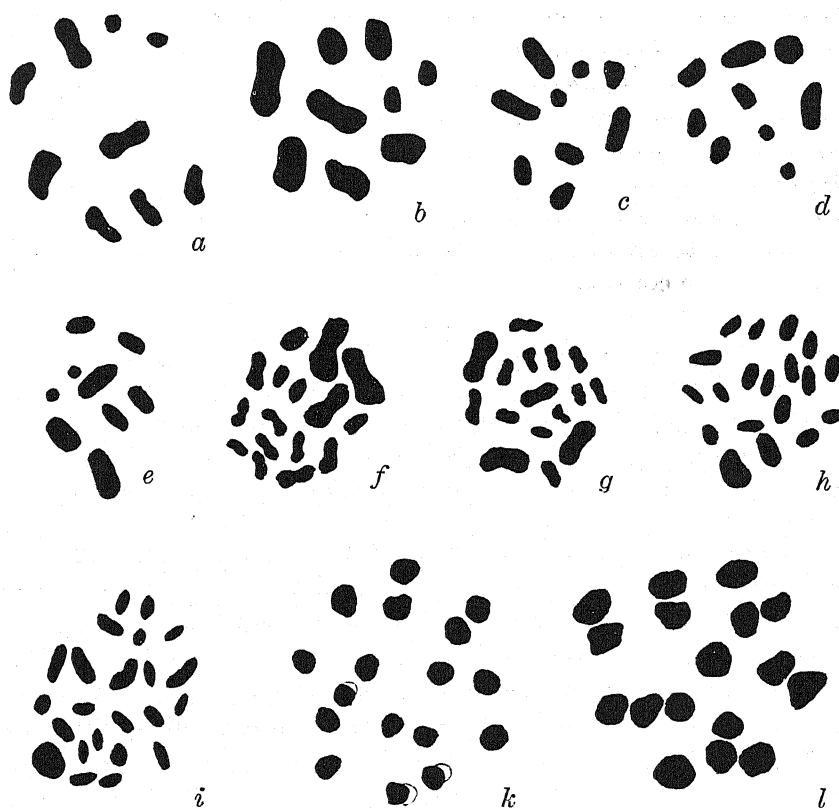
phenomenon. *A priori*, the research worker has been compelled to adopt the idea that "secondary attraction" really *is* an attraction of a secondary nature. In order to remove the unfortunate influence of such an inadequate terminology, the writer (l.c. 1936) has, therefore, suggested to call the arrangement under discussion simply "association", instead of "secondary association". The words "attraction" and "pairing" should not at all be used in this connection.

II

In his aforesaid work (l.c. 1936), the writer has presented analytical data on chromosome association in three species of *Carex*. These data tend to show, more or less convincingly, that there are no direct or simple interrelations between chromosome association and chromosome homology. The association is not a pairing or attraction between homologous chromosomes, but is probably a sorting and associating effect of the forces of nuclear division upon chromosomes of different size and mass. For data, supporting this thesis, the reader is referred to the aforesaid paper.

Now, the question arises: are the results from *Carex* applicable to other organisms? And further: how much stress should now be laid upon the results of previous investigations into the problem, especially those dealing with apples (DARLINGTON and MOFFETT 1930, HEILBORN 1935), *Dahlia* (LAWRENCE 1931), and *Brassica* (CATCHESIDE 1934)?

In drawings of apples, *Dahlia* and *Brassica*, published in order to illustrate chromosome associations, the associated chromosomes appear in close proximity to one another (though generally not in actual contact). In my material of *Carex* such differential approximation is much less pronounced. Fig. 1 *a-i* show some cases of association in *Carex*, fig. 1 *k-l* two metaphases of apples. The metaphase plate of fig. *k*—which is a type less common in apples—is in every respect comparable to the *Carex*-cases, the type of fig. *l*—more common—is the same as those presented by DARLINGTON and MOFFETT. The present writer has studied both apples and *Carex* for years, and is of opinion that apple-nuclei are more liable to shrink during prometaphase and metaphase and more difficult to fix than those of *Carex*. This may account for the different appearance of the metaphase plates. The writer has convinced himself that the chromosome associations of both plants are identical phenomena, and that there are only small differences of degree. The interpretations, presented in my paper on *Carex* (l.c. 1936), should therefore be applicable to *Pyrus* as well. The same obviously also holds good for *Dahlia* and *Brassica*. In all the three last-mentioned genera, chromosomes are



Text fig. 1. Association of chromosomes. *a-b* *Carex pilulifera* ($n = 9$), metaphase I; *c-e* *C. pilulifera*, metaphase of primary pollen nucleus; *f-g* *C. panicea* ($n = 16$), metaphase I; *h* *C. montana* ($n = 19$), metaphase I; *i* *C. Davalliana* ($n = 23$), metaphase I; *k* apple variety "Åkerö" ($n = 17$), metaphase I; *l* apple variety "Cellini" ($n = 17$), metaphase I.—Note association generally between chromosomes of equal size! *a-i* 4,000 \times ; *k-l* 5,000 \times .

associated in groups or short rows, in the same way as in *Carex*, and the grouping should be given the same mechanical interpretation as presented in my recent paper. Conf. in this connection also ADATI 1933, p. 186.

In some recent works on "secondary association", drawings are presented showing the associated chromosomes connected by fine strands. The nature of these strands is uncertain, though there seem to be reasons for regarding them as artefacts. From *Carex*, at any rate, I have convincing evidence that such strands are often induced by poor or less suitable fixation. They may appear also at diakinesis. In really good fixations, however, there are no physical connections between associated chromosomes.—In some recent works (GUSTAFSSON 1934, 1935, 1936), much stress has been laid upon the possible significance of such strands. It is true that the strands

between the associated *univalents* in GUSTAFSSON's material may be of another and more significant type though this seems somewhat uncertain. It is, however, necessary to emphasize explicitly that GUSTAFSSON deals with a quite distinct phenomenon, viz. a certain kind of late or metaphase conjugation, and not with a "secondary association" of the common type. For reasons briefly criticized in my above paper (l.c. 1936, p. 182-183), a certain confusion of ideas has here led to an interpretation of chromosome association which can scarcely be correct.

III

From the data in my previous work (l.c. 1936), and from the preceding discussion, the following conclusions should be drawn regarding chromosome association:

1) The phenomenon should simply be called "association" (not "secondary association", "secondary attraction" or "secondary pairing");

2) This association probably has a purely mechanical origin, being a sorting and associating effect of the forces of nuclear division upon chromosomes of different size and mass;

3) In this way chromosomes of *equal size* are associated irrespective of homology, but *if* homologous chromosomes are present, they should show association on account of identity in size.

The chief interest, taken in such chromosome association, pertains to the possibility of analyzing chromosome homologies in "secondary polyploids". By studying chromosome associations it has seemed possible to elucidate the original basic number of chromosomes in presumed "secondary polyploids" (especially in apples, *Dahlia* and *Brassica*). How far does the writer's mechanical interpretation interfere with this method of analysis?

Perhaps not so much as one might believe! According to current British ideas, widely accepted, "secondary association" joins *homologous* chromosomes, according to the writer's interpretation chromosomes of *equal size* are associated irrespective of homology. Consequently, according to current conceptions, the statistics published on chromosome association in apples, *Dahlia* and *Brassica* (l.c.), as well as in *Umbelliferae* and *Bicornes* (WANSCHER 1934), should give information regarding the number of distinct classes of homologous chromosomes. According to the writer's interpretation, again, these statistics only supply somewhat approximate information as to the *probable number of distinct size classes of chromosomes*. Hence, in apples there should be 7 size classes, in *Brassica* 6! As *homologous* chromosomes can *never* be of *unequal* size, it is safe to conclude that apples contain *at least* 7 distinct types of homologous chromosomes,

while *Brassica* contains at least 6. There may be more than 7 types of homologues in apples, and more than 6 types in *Brassica*, but as non-homologous chromosomes rarely are of exactly the same size and mass, this probability is perhaps not very great.

To summarize: analysis of chromosome associations would seem to supply information as to the smallest possible number of distinct classes of homologous chromosomes, while a somewhat higher number is not excluded. Used in the above way, this cytological method should still be of some value for the study of "secondary polyploidy".

Literature Cited

- Adati, S. 1933. Untersuchungen über die Chromosomenzahlen bei asiatischen wilden *Pyrus*-Arten.—Cytologia 4.
- Catcheside, D. G. 1934. The chromosomal relationships in the swede and turnip groups of *Brassica*.—Ann. of Bot. 48.
- Darlington, C. D., and Moffett, A. A. 1930. Primary and secondary chromosome balance in *Pyrus*.—Journ. of Gen. 22.
- Gustafsson, Å. 1934. Secondary association between homologous univalents.—Svensk Bot. Tidskr. 28.
- 1935. Primary and secondary association in *Taraxacum*.—Hereditas 20.
- 1936. Die sekundäre Paarung zwischen Univalenten.—Svensk Bot. Tidskr. 30.
- Heilborn, O. 1935. Reduction division, pollen lethality and polyploidy in apples.—^{*} Acta Horti Bergiani 11. 7.
- 1936. The mechanics of so-called secondary association between chromosomes.—[∞] Hereditas 22.
- Lawrence, W. J. C. 1931. The secondary association of chromosomes.—Cytologia 2.
- Wanscher, J. H. 1934. Secondary (chromosome) associations in Umbelliferae and Bicornes.—The New Phytologist 33.
-

Contributions to the Morphology of *Sciadopitys verticillata*

By

Masato Tahara

Biological Institute, Tôhoku Imperial University, Sendai

Sciadopitys verticillata SIEB. et ZUCC. is a conifer endemic to Japan. In 1910 LAWSON published an account concerning the gametophyte and embryo of this plant. His observation was not, however, complete, owing perhaps to the paucity of his material. The present study was undertaken primarily to fill in the gap in his investigations. The material used in the present research was obtained from a large tree growing in the grounds of the Kameoka-Hachiman, a small shrine in the suburbs of Sendai. The fixation was made by a strong chrom-acetic solution (1% chromic acid 100 cc, glacial acetic acid 3 cc) after dipping the material into CARNOY's solution for a few minutes. Section 7-25 μ in thickness were stained with NEWTON's gentian violet iodine.

I. The Male Gamete

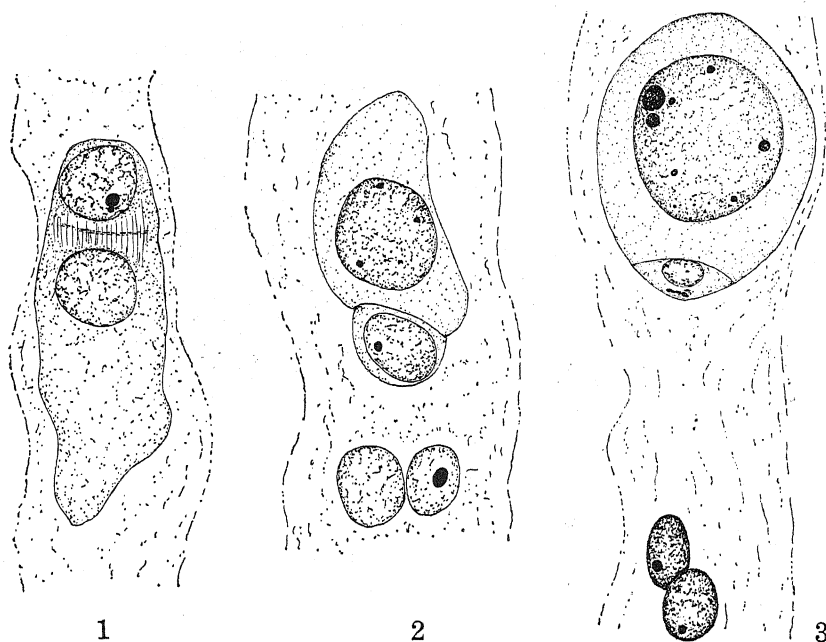
It is well known, that the sperms found in the Cupressaceae and Taxodiaceae are distinctly organized cells and that the two sperms produced in a pollen tube are exactly alike in size and structure and that both have the function of fertilizing the egg. But in the Abietaceae, the cell division does not follow the nuclear division in the body cell and as the pollen tube is about to discharge the sperms, the boundary of the body cell becomes indistinct and the two sperm-nuclei are left free in the general cytoplasm of the pollen tube. Furthermore, the archegonia being separated from one another by sterile tissue, only one of the two sperm-nuclei can function and the disparity in size of the two sperm-nuclei is distinct.

Sciadopitys verticillata is generally considered as a member of the family Taxodiaceae. But in several important points, this plant differs from the other members of the family. The archegonia, for example, are separated by sterile tissue as in the Abietaceae; the usual members of the Taxodiaceae form an archegonium complex. Concerning the sperms, LAWSON describes them in his paper on *Sciadopitys verticillata*, as follows:

"The division of the body-cell evidently takes place in the tip of the tube immediately over the neck-cells of the archegonium and it results, not in the formation of two cells as in *Sequoia* and

Cupressineae, but in two free nuclei. From the large number of cases examined showing these stages, it became quite evident that there was no cell membrane separating these two male nuclei from one another. The two structures were found lying quite freely in the cytoplasm of the body cell, as is shown in Fig. 12 and one of them is slightly but distinctly larger than the other."

The results of my observations are totally different. The pollen tube growing through the upper part of the nucellus enters into the archegonial chamber a few days before the fertilization. Near the end of the tube, the pollen tube nucleus and the stalk cell nucleus and a short distance behind the elongated body cell are seen. The nucleus of the body cell in this stage of development is always situated near the extremity of the cell. The division of the nucleus in the body cell takes place almost simultaneously with the nuclear division in the central cell of the archegonium to form the egg- and the ventral canal-nucleus. The resulting two nuclei are at first quite alike and between them a cell plate is formed (Fig. 1). Thus a cell division occurs in contradiction to LAWSON's description. Owing to the position of the nucleus of the body cell, the cell is divided into two unequal portions (Fig. 2). Afterwards the difference in size and struc-



Figs. 1-3. 1. The body-cell. Mitosis in telophase. $\times 450$. 2. The two unequal sperm-cells, the pollen-tube nucleus and the stalk-nucleus. $\times 450$. 3. The same in a later stage. $\times 450$.

Contributions to the Morphology of *Sciadopitys verticillata*

By

Masato Tahara

Biological Institute, Tôhoku Imperial University, Sendai

Sciadopitys verticillata SIEB. et ZUCC. is a conifer endemic to Japan. In 1910 LAWSON published an account concerning the gametophyte and embryo of this plant. His observation was not, however, complete, owing perhaps to the paucity of his material. The present study was undertaken primarily to fill in the gap in his investigations. The material used in the present research was obtained from a large tree growing in the grounds of the Kameoka-Hachiman, a small shrine in the suburbs of Sendai. The fixation was made by a strong chrom-acetic solution (1% chromic acid 100 cc, glacial acetic acid 3 cc) after dipping the material into CARNOY's solution for a few minutes. Section 7-25 μ in thickness were stained with NEWTON's gentian violet iodine.

I. The Male Gamete

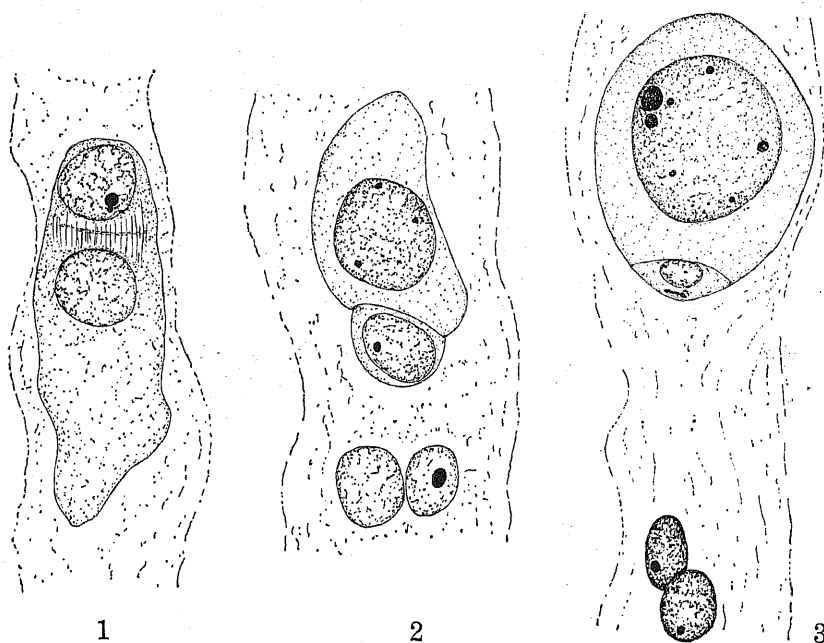
It is well known, that the sperms found in the Cupressaceae and Taxodiaceae are distinctly organized cells and that the two sperms produced in a pollen tube are exactly alike in size and structure and that both have the function of fertilizing the egg. But in the Abietaceae, the cell division does not follow the nuclear division in the body cell and as the pollen tube is about to discharge the sperms, the boundary of the body cell becomes indistinct and the two sperm-nuclei are left free in the general cytoplasm of the pollen tube. Furthermore, the archegonia being separated from one another by sterile tissue, only one of the two sperm-nuclei can function and the disparity in size of the two sperm-nuclei is distinct.

Sciadopitys verticillata is generally considered as a member of the family Taxodiaceae. But in several important points, this plant differs from the other members of the family. The archegonia, for example, are separated by sterile tissue as in the Abietaceae; the usual members of the Taxodiaceae form an archegonium complex. Concerning the sperms, LAWSON describes them in his paper on *Sciadopitys verticillata*, as follows:

"The division of the body-cell evidently takes place in the tip of the tube immediately over the neck-cells of the archegonium and it results, not in the formation of two cells as in *Sequoia* and

Cupressineae, but in two free nuclei. From the large number of cases examined showing these stages, it became quite evident that there was no cell membrane separating these two male nuclei from one another. The two structures were found lying quite freely in the cytoplasm of the body cell, as is shown in Fig. 12 and one of them is slightly but distinctly larger than the other."

The results of my observations are totally different. The pollen tube growing through the upper part of the nucellus enters into the archegonial chamber a few days before the fertilization. Near the end of the tube, the pollen tube nucleus and the stalk cell nucleus and a short distance behind the elongated body cell are seen. The nucleus of the body cell in this stage of development is always situated near the extremity of the cell. The division of the nucleus in the body cell takes place almost simultaneously with the nuclear division in the central cell of the archegonium to form the egg- and the ventral canal-nucleus. The resulting two nuclei are at first quite alike and between them a cell plate is formed (Fig. 1). Thus a cell division occurs in contradiction to LAWSON's description. Owing to the position of the nucleus of the body cell, the cell is divided into two unequal portions (Fig. 2). Afterwards the difference in size and struc-



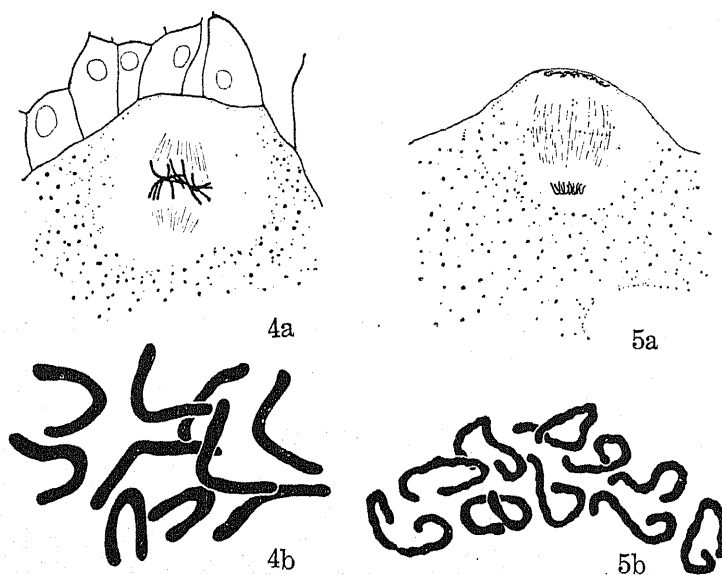
Figs. 1-3. 1. The body-cell. Mitosis in telophase. $\times 450$. 2. The two unequal sperm-cells, the pollen-tube nucleus and the stalk-nucleus. $\times 450$. 3. The same in a later stage. $\times 450$.

ture of these two cells becomes more evident and finally in most cases the smaller one becomes entirely disintegrated (Fig. 3).

According to LAWSON's description, the sperm of *Sciadopitys verticillata* closely resembles that of the Abietaceae. But my investigation shows that it is just like the one found in some members of the Taxaceae and Podocarpaceae, where the sperm is a distinctly organized cell and the size-difference of the two sperms produced by the division of a body cell is quite evident.

II. The Ventral Canal Nucleus

As already stated, a few days before the fertilization the nuclear division to form the ventral canal nucleus and the egg nucleus occurs in the central cell of the archegonium. The material collected on the 11th of June of this year has shown a number of these divisions. Fig. 4, a is the metaphase of this division. The spindle is formed just under the neck of the archegonium. A cross section of the ovule has fortunately shown the polar view of the nuclear plate of this division. The chromosome number is clearly determined to be 10 (Fig. 4, b). According to LAWSON the haploid chromosome number of this plant is 8. But recently SAX and BEAL (1934) reported in their paper on the chromosomes of the Cycadales that this plant has 10 pairs of chromosomes in diploid tissues. It is a remarkable fact that all the other members of the Taxodiaceae and Cupressaceae have 11 chromosomes in haploid generation.



Figs. 4-5. 4, a. Mitosis in metaphase to form the ventral canal nucleus and the egg nucleus. $\times 400$. b. The same in polar view. $\times 1600$. 5, a. The same in anaphase. $\times 400$. b. The same in polar view. $\times 1600$.

In anaphase the two halves of the chromosomes move toward opposite poles. The v-shaped chromosomes assembled at the inner pole form a compact group, while those at the outer pole are scattered loosely and lie almost in a plane, just as in the metaphase (Fig. 5, a). So the polar view of the latter enables us again to determine easily the exact number of the chromosomes (Fig. 5, b). In telophase the nucleus formed at this pole is much compressed and soon disorganizes. Cell division does not follow this nuclear division, as is usual with the members of the Taxodiaceae.

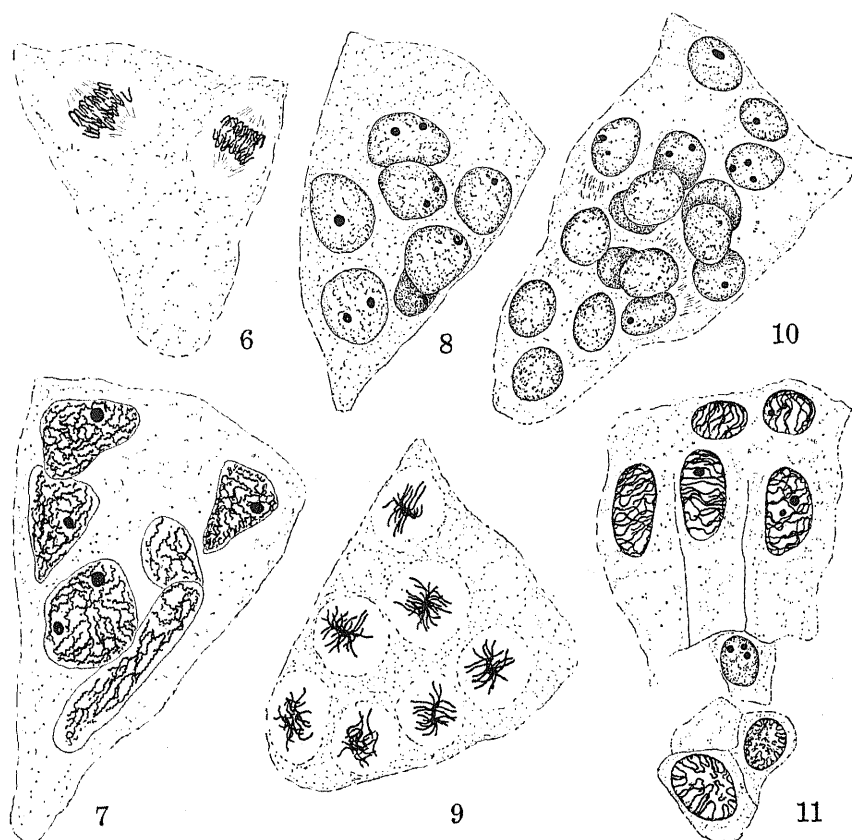
III. The Proembryo

My observations regarding fertilization are still incomplete and will be reported in a subsequent paper.

The first mitosis after the fertilization was met with several times in my preparations. Its position within the archegonium varies according to the circumstances. It may lie near the middle of the archegonium or a little higher up in the same. In the metaphase of this division the membrane of the fusion nucleus has already disappeared and the spindle lies in a mass of dense cytoplasm. At the beginning of this stadium we see two chromosome-groups. But these soon come together and form a spindle of the usual appearance.

The two nuclei resulting from the first mitosis are at first small, but soon enlarge and divide simultaneously to form four nuclei. These four nuclei pass to the base of the archegonium, where three more free nuclear divisions take place also simultaneously and 32 free nuclei are produced (Fig. 6-10). These 32 nuclei then become arranged in three tiers, each of which contains about 10 nuclei. The cell-wall formation has its beginning in this stage. But this process is restricted to only the middle and lower parts of the embryo. Meanwhile the 6th nuclear division takes place almost simultaneously. Text-fig. 11 shows the prophase of this division. Although I could not see the metaphase of this division, it is certain that the long axis of the spindle of the division in the middle tier should be placed mainly parallel to the long axis of the archegonium, because we see in a cross section of this part of the embryo about the same number of cells fore the beginning and after the end of this division.

After this nuclear division the formation of the cell-wall becomes completed. But in the uppermost tier, always some of nuclei remain free without forming the cell-wall and often, not always, some are found in the cells, distal ends of which are open to the general cytoplasm of the archegonium. Later the cells of the middle tier become much elongated and send the group of cells of the lowest tier toward the center of the endosperm.



Figs. 6-11. The development of the proembryo. $\times 350$. 6. The 3rd. mitosis after the fertilization. 7. 8-nucleate stage. 8. 16-nucleate stage. 9. 5th mitosis. 10. 32-nucleate stage. 11. 6th mitosis.

In 1931 BUCHHOLZ published a paper concerning the later embryogeny of this plant. The remarkable cleavage polyembryony described and figured by him could be easily confirmed by dissecting the fresh material in sugar solution and staining it with ruthenium red.

LAWSON's description regarding the development of the embryo is rather simple. He believed that only 8 free nuclei could exist before the formation of the cell-wall. In the Conifers the number of free nuclei in early embryogeny varies according to the family. Four free nuclei are common in the Abietaceae, the Taxodiaceae and the Cupressaceae. The highest number is reported in the family Araucariaceae. BURLINGAME found 32 in *Araucaria brasiliensis* and EAMES found 32 or 64 in *Agathis australis*. Therefore *Sciadopitys verticillata* also differs, in this characteristic from other members of the Taxodiaceae. It stands just at the level of the Araucariaceae.

IV. Summary

1. In *Sciadopitys verticillata* the cell division follows the mitosis in the body cell. The nucleus being situated near the extremity of the cell, the two resulting cells show a remarkable dissimilarity in size and structure.

2. The mitosis to form the neck canal nucleus and the egg nucleus occurs just under the neck cells of the archegonium. The polar view of the spindle clearly shows 10 chromosomes. In the anaphase, the v-shaped chromosomes in the inner pole form a compact group, while those at the outer pole are scattered loosely and lie almost in a plane similar to those in the metaphase. The polar view of the latter enables us to determine easily the exact number of the chromosomes.

3. After fertilization 5 successive nuclear divisions occur and produce 32 free nuclei before the formation of the cell-wall.

In conclusion I wish to express my hearty thanks to Mr. K. OIKAWA for the assistance given me during the course of the present investigation.

Literature Cited

- Buchholz, John T. (1931): The suspensor of *Sciadopitys*. Bot. Gaz. 92.
Burlingame, L. L. (1915): The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Bot. Gaz. 59.
Eames, A. J. (1913): The morphology of *Agathis australis*. Ann. Bot. 27.
Lawson, A. A. (1910): The gametophytes and embryo of *Sciadopitys verticillata*. Ann. Bot. 24.
Sax, K., and Beal, J. M. (1934): Chromosomes of Cycadales. Jour. Arnold. Arb. 15.

**Chromosome Studies on *Trillium kamtschaticum* Pall.
V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature**

By

Hajime Matsuura

Hokkaido Imperial University, Sapporo

Within the last decade much effort has been devoted by cytogeneticists to the discovery of both the genetic and the non-genetic factors which affect the structure and behavior of chromosomes during nuclear divisions. The genes controlling the normal meiotic procedures have been found in several plants, and also many experiments have been carried out on the effects of environmental factors such as abnormal temperature, ultra-violet ray, x-ray, radium ray, several narcotics, centrifuging, etc., upon the nuclear division. These efforts must be of significance in that it is from these studies in comparison with the normal behavior of chromosomes that one may expect to obtain most definite knowledge of the fundamental mechanism of mitosis and meiosis.

To this end, the writer has studied the effects of high temperature on the meiotic divisions in the PMC of *Trillium kamtschaticum*. In view of the previous conclusions that the kinetochore of the chromosome differs in structure and in behavior from the rest of the chromonemata and plays a rôle as the guide of the chromosome movements in nuclear division (*cf.* No's II-IV of this series), it will be important to see how abnormal temperature yields abnormal behaviors of these parts of the chromosome.

Material and Methods

The results to be reported in the present paper are those obtained by experiments carried out repeatedly during three successive seasons (1933-'35), using several hundred plants each year which had been collected from several localities near Sapporo and transplanted in pots. These pots were grouped into many classes and were put into a green-house of an average temperature of 16°C at intervals of one week each from early September to February of the following year. Some of the plants were allowed to remain there through the whole year. Since under natural conditions, the meiotic divisions in this plant usually take place in early March under the snow, the plant seems to be very susceptible to temperature, even to such a relatively low temperature, yielding several

abnormalities in meiosis. The effects of abnormal temperature were however extremely variable sometimes amongst the plants under the same treatment, probably because of inconstant temperature of the green-house and of the different stages of the PMC in different individuals at the time of exertion of the stimulus.

Both acetocarmine smears and permanent ones (as described in the previous papers) were made for the present study. All photomicrographs in the present paper were from acetocarmine preparations.

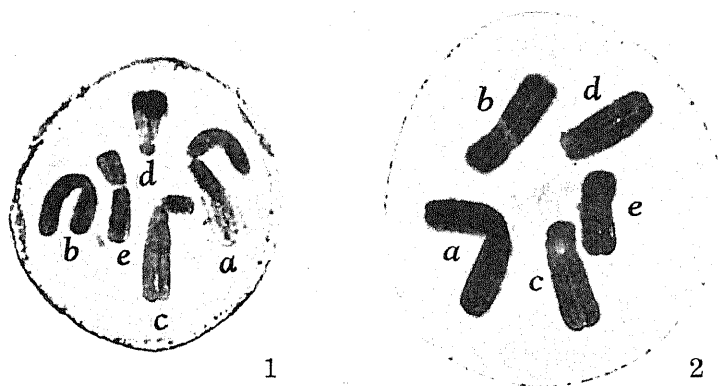
The designation of the chromosome members within a complement is the same as in the previous papers.

Observations

In the following descriptions, the abnormalities observed were classified into two categories, (i) concordant and (ii) discordant, with respect to the relationship in behavior between the kinetochore and the rest of the chromonema.

i) *Concordant anomalies*

In the first paper of this series, the writer has described an abnormal form of meiotic metaphase referred to as 'Abnormal I' which is characterized by greater dimensions of mother-cells and by broader and shorter chromosomes than in the control material. This type of abnormality was obtained by putting the plants into the green-house a few weeks before the meiotic divisions took place. Apparently it is due, through the effects of high temperature, to a more rapid growth of mother-cells and more rapid condensation of chromosomes (spiralization of the chromonemata) than in the untreated plants. Though such cells are abnormal in respect to these

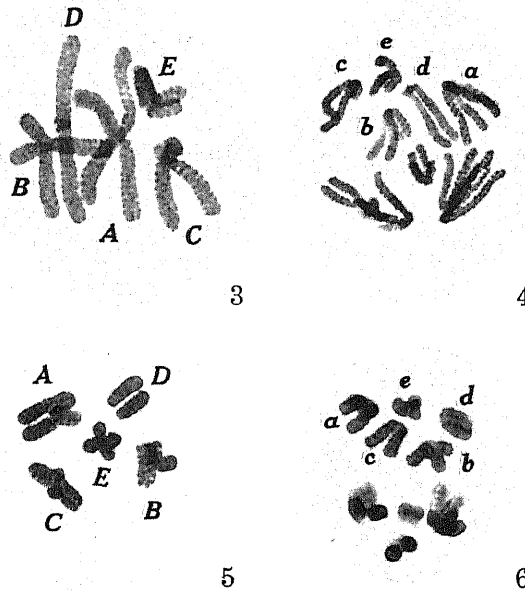


Text-figs. 1 and 2. 1 represents a normal pollen grain at the first vegetative division; 2, a pollen grain from a plant which was subjected to high-temperature. $\times 1463$, reduced to $2/3$ in reproduction.

features, the behavior of the chromosomes in subsequent divisions is quite normal, and it is interesting to see that the resultant pollen grains retain also the same characteristics (or in a more exaggerated form) in respect to the dimensions of cells and chromosomes (Text-figs. 1 and 2).

On the other hand, mother-cells shown in Text-figs. 5 and 6 are of a type diametrically opposing to Abnormal I type. In them the cell is exceedingly small and likewise the chromosomes are very short, nearly one-half or two-fifths of the normal chromosomes (Text-

figs. 3 and 4). Such cells were found in preparations in which the 'precocious' type of chromosomes (*v. infra*) is usually found, and hence it is clear that they are due, through the effects of high temperature, to the exceedingly greater speed with which the meiotic chromosome development is completed than in the control material. This type seems to be normal in the subsequent divisions and to yield tetrads of normal appearance.



Text-figs. 3-6. 3 and 4, metaphase and anaphase of the first meiotic division in normal pollen mother-cells respectively; 5 and 6, corresponding stages in extremely small mother-cells. $\times 747$, reduced to $\frac{9}{10}$ in reproduction.

These two abnormal cases illustrated here are of the opposite extreme types found during the course of the present study, and it is highly probable that there are continuous grades between them (including the normal type) in respect to the dimensions of pollen mother-cells and chromosomes. These anomalies will be called 'concordant anomalies', because of the concordant behavior of the kinetochore with the rest of chromonemata, as evidenced by the normal regularity in the formation of bivalents; they make a marked contrast with 'discordant anomalies' which will be described in the following section.

ii) *Discordant anomalies*

To this category belong cases in which the behavior of the kinetochore is not in harmony with the development of the rest of chromonemata. This discordant behavior of the kinetochore was found to yield three abnormal forms which in the following descriptions will be referred to as (a) precocious, (b) desynaptic and (c) asynaptic. Through these anomalies, the precocious behavior of the kinetochore as compared with the other part of the chromonemata is the characteristic in common, and they are principally characterized by different time relationship in the unharmony between both chromosome components.

Before going further, it is necessary to give an account of the normal prophase stages in this plant. Unfortunately the observations have not been extensively carried out, but the following brief description will serve as a control for studies of these abnormal forms.

In the normal case of meiosis, the leptotene stages are characterized by very fine single threads which appear to coil themselves in very minute spirals. At pachytene homologous chromosomes are closely paired along their entire length. These stages are definite ones for the whole nucleus and there is no evidence to show that these stages may occur coincidentally in different parts of the same chromosome, as stated by Huskins and Smith ('35) in *Trillium erectum*. Furthermore no evidence showing such chromomere structure as these and other authors describe has been gained by the writer in his best treated preparations (Matsuura '36). The pachytene pairs open out in early diplotene and usually take a cruciform type of bivalents, pairs of paired chromatids associating at the kinetochore and the formation of chiasmata being exceedingly rare. These are also characteristic features at diakinesis and metaphase. For the structure of metaphase chromosomes one may refer to the third paper of this series. The first anaphase chromosomes pass without marked interkinesis to the second metaphase.

At early stages of meiosis, the kinetochores are difficult to be traced; at diplotene however they are identifiable as fine unstained threads which in many cases appear not to separate. The first visible separation of the associated kinetochores takes place at diakinesis or pro-metaphase and the second separation at late anaphase just before interkinesis. The first separation has been inferred to occur in both reductional and equational modes and to be independent of the modes of opening out of the chromatid pairs at diplotene which is also predicted to occur in both reductional and equational planes (cf. No. III of this series).

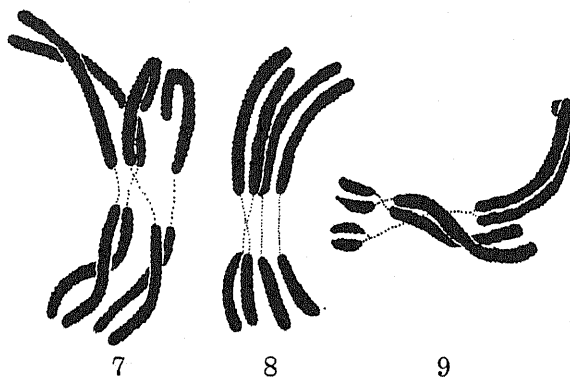
a) Precocious

(Refer to Plate 1)

This type was obtained from plants which were placed in the green-house a few months before the meiotic divisions took place. The characteristic configurations of the first metaphase chromosomes

of this type were described and figured in No's I and IV of this series.

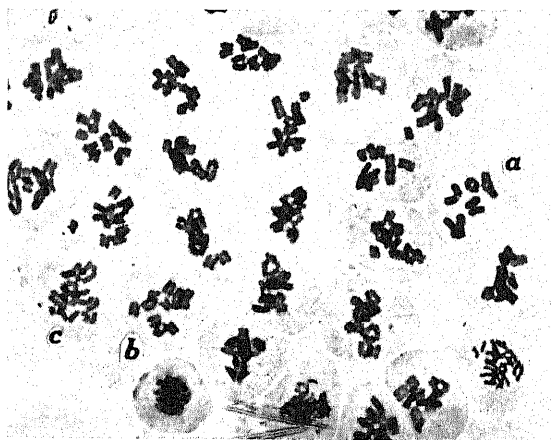
Compared with the normal case, the prophase of the precocious type is characterized by (i) considerably thicker and shorter pachytene chromonemata (Fig. 1) and (ii) distinctly earlier separation of paired chromatids (Fig. 2).



Text-figs. 7-9. Three tetrads of the precocious type at 'diplotene'. 7 and 9 were taken from a cell illustrated in Fig. 6, Pl. 1, and 8 from a cell illustrated in Fig. 5, Pl. 1. $\times 1,900$, reduced to 4/5 in reproduction.

The chromatid separation occurs soon after the pachytene pairing is completed and consequently results in the formation of four strands which run parallel two by two and are associated only at the kineto-

chore region (Fig. 3). The chromonemata contract during successive stages and at stages corresponding to late diplotene and diakinesis, the kinetochores appear as fine threads exceedingly stretched out (Figs. 4-6). This condition is so striking in some cases that the kinetochores region is hardly visible and one meets with difficulties in identifying the two component arms of a

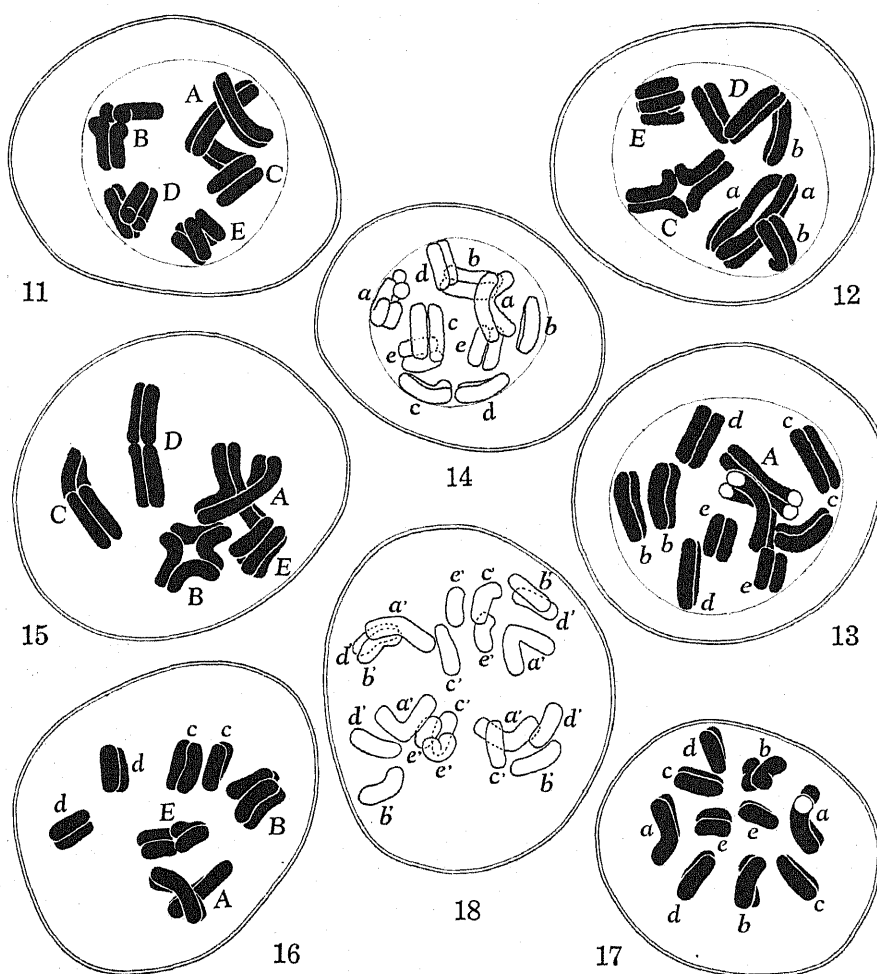


Text-fig. 10. Illustrating variation of chromatid association in the precocious type within the same locus. The cell marked 'a' represents the typical precocious-b type, that marked 'b' the typical precocious-a type and that marked 'c' its anaphase. Note several intermediate forms as to this feature in other cells. $\times 153$.

chromosome. This seems to suggest that at these stages a certain repulsion acts intrachromosomally between the two component arms as well as between different chromosomes.

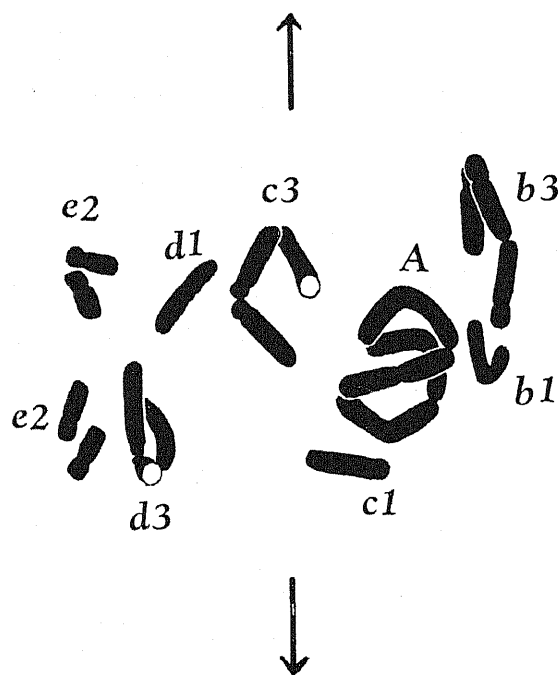
There are two types of chromosome pairing distinguishable at these stages. One is the formation of two dyad pairs which lie very close together at first but later fall apart from each other, and the other is the formation of a tetrad, the four strands taking characteristic configurations described in the previous papers. The former is referred to as 'precocious-a' type and the latter as 'precocious-b' type.

These two types of pairing are caused by differences in the time



Text-figs. 11-18. 11-14, diakinesis, 15-17, metaphase, 18, anaphase. 11 and 15, typical precocious-b type; 14, 17 and probably 18, typical precocious-a type; others, several intermediate forms. $\times 1750$, reduced to $1/2$ in reproduction.

of separation of the associated kinetochores, *viz.*, according to whether they are subjected to the first and the second separations with a certain interval between them, allowing thus the falling apart of pairs of paired chromatids (precocious-a) or whether they are subjected to these separations taking place nearly coincidentally (precocious-b). These conditions are illustrated in Text-figs. 7-9. Text-fig. 7 represents tetrad A in which the two successive separations of the kinetochores have been completed. Text-fig. 8 represents tetrad B in which the kinetochores are separated in their daughter half, but still associated in the other half. Text-fig. 9 represents tetrad C in which the second separation of the kinetochores has not been initiated. Both these types of chromosome configurations may occur in different mother-cells in the same locus (Text-fig. 10) and even in the same cell. As illustrated in Text-figs. 11-18, it is clear that there are gradual variations between these types. In some cases



Text-fig. 19. The distribution of chromatids to the poles at early anaphase in a cell of the precocious-b type. Note a ring of four chromatids in tetrad A. In drawing the chromosomes were spaced out. From permanent smear preparation. $\times 1,640$.

however nearly all cells in a locus were of the precocious-a type and those in another of the precocious-b type. In such cases it was demonstrated that in the precocious-a type, the anaphase distribution of the total 20 chromatids is always 10-10, while in the precocious-b type, very irregular distributions are commonly met with. In 75 mother-cells which were presumably supposed to be of the precocious-b type, three kinds of distributions, 10-10, 11-9 and 12-8,

were found to occur in the frequency of 40, 17 and 9 respectively. These modes of division are illustrated in Figs. 9-11, Pl. 1. Text-fig. 19 represents chromosome configurations at early anaphase in a com-

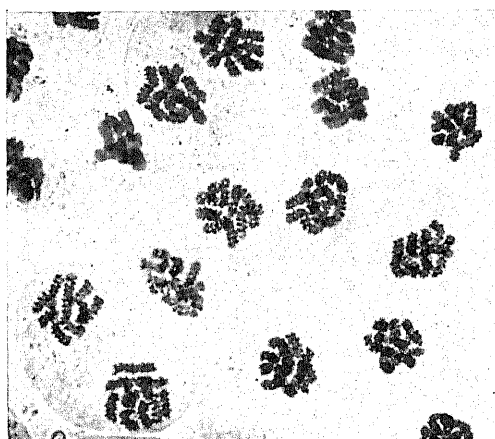
plete cell. Such a case would yield a chromatid distribution either of 10-10, 12-8 or 11-9, according to whether tetrad A divides 1-3, 3-1 or 2-2.

The telophase chromosomes in the precocious type (both a and b) are normal in appearance for a short while (Text-fig. 20), but they are incapable of orientating themselves properly at the second division and as a corollary they come to form micro-nuclei of variable numbers and sizes in a scattered form (Text-fig. 21).

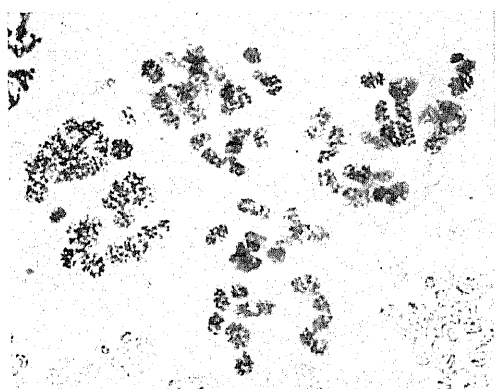
b) Desynaptic

The 'desynaptic' type differs from the precocious one merely in that the former is characterized by typical univalents (10 in number) at first metaphase (Text-fig. 22), instead of separated pairs of chromatids in the latter. Such cells are usually found in

preparations in which the precocious type is predominant and nearly equal in the chromosome size with the latter (compare Text-fig. 22 with Fig. 8, Pl. 1). Sometimes however cells characterized by longer univalents are met with, suggesting the operation of a different concordant relationship between the kinetochore and the rest of the chromonemata within the desynaptic type. Apparently desynapsis is caused by a slight delay in the second separation of the associated kinetochores as contrasted with the precocious type.

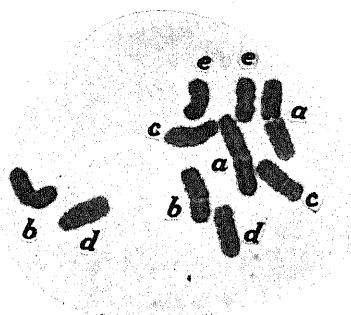


20



21

Text-figs. 20-21. 20, pollen mother-cells at first telophase of the precocious type; 21, failure of the second division. $\times 480$.



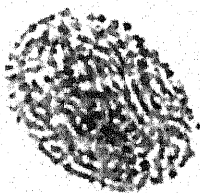
Text-fig. 22. Metaphase plate of the desynaptic type. $\times 747$.

c) Asynaptic

(Refer to Plate 2)

The 'asynaptic' type of division in the PMC was observed in September 1934 in a few plants which had been left in the greenhouse from December of the preceding year. This indicates that the division occurred about five months earlier than in untreated plants.

At the resting stage, the individual threads are seen to be very different in appearance in the normal and in the asynaptic type. In normal plants (including precocious and desynaptic ones), the threads are relatively thick and run somewhat parallel on the periphery of the nucleus (Text-fig. 23). In the asynaptic type the threads at this



Text-fig. 23. A PMC at the resting stage from the control material. $\times 1,000$.

stage are much more slender and appear to be more numerous than do the threads in the corresponding stage of the normal type (Fig. 12, Pl. 2). This condition is considered to have resulted from the splitting in each thread having already occurred, as in the ordinary mitosis. It is also a noteworthy fact that in the prophase nucleus of the microsporocytes of this type there is no such leptotene stage as is found in normal meiosis, and the chromonemata contract without any indication of polarization (Figs. 13, and 21a) and come to form definite thick spiremes (Fig. 14). These prophase conditions are much more like

those in somatic mitosis than in meiosis, with the exception that in the present case the two threads constituting a chromosome are closely associated, giving no appearance of duality throughout their entire length, instead of the formation of two separate threads twisting with each other as in the ordinary mitosis. These prophasic conditions lead obligatorily to the formation of ten univalent chromosomes, as shown by Fig. 15, Pl. 2 which represents a mother-cell at a stage corresponding to diplotene. It will be clearly seen in this photomicrograph that each chromosome consists of four chromonemata which run somewhat parallel with each other, a condition quite similar to the normal meiotic chromosomes at such a stage, though it is unclear at the present time how and when such a quadruple structure of a chromosome has arisen.

During diakinesis-like stages, the chromosomes contract much (Figs. 16 and 17) and at metaphase they are characterized by double-spiral structure as in the normal meiotic metaphase chromosomes (Fig. 19), though they are exceedingly shorter, about half the length of the latter (*cf.* Text-fig. 3). At anaphase ten half-univalents regularly pass to the poles (Figs. 20 and 21b) and they constitute a resting nucleus there (Fig. 22). The dyads appear to be functionless, no further division taking place. Occasionally however the daughter nuclei may divide by an amitosis-like procedure and come to take a tetrad-like appearance (Fig. 23). This seems to suggest that the poles of the second division are still retained somehow.

Discussion

The behavior of the kinetochore in meiosis

§ The present findings indicate that (i) through the effect of high temperature both the kinetochore and the rest of the chromonemata come to accelerate their behavior in meiosis; (ii) when this acceleration is balanced in both the parts of the chromosome, 'concordant anomalies' result, *i.e.*, those differing from the normal type merely in the dimensions of entire pollen mother-cells and chromosomes, but quite normal in the formation of bivalents and their division; and (iii) when the acceleration is unbalanced, *i.e.*, a certain quicker behavior of the kinetochore occurs than of the rest of the chromonemata, a condition reverse to the normal meiotic case (*incl.* concordant anomalies), where the separation of the associated kinetochores is slightly delayed in relation to that of the other part of the chromonemata, it results in 'discordant anomalies', as described under the names, 'precocious', 'desynaptic' and 'asynaptic'.

Previously several authors have demonstrated such an acceleration of chromosome behavior in meiosis through the effects of abnormally high or low temperature, as evidenced by the appearance of univalents at metaphase instead of bivalents, or by the occurrence of premature splitting of chromosomes, *e.g.* Sakamura & Stow ('26) in *Gagea*, Stow ('27) in *Solanum*, Shimotomai ('27) in *Liriope* and *Scilla*, Takagi ('28) in *Lychnis*, Heilborn ('30) in Apples, Katayama ('31) in *Triticum-Aegilops* hybrids, Oehlkers ('35) in *Oenothera*, Straub ('36) in *Rhoeo* and others, Nakamura ('36) in *Impatiens*, *etc.* The occurrence of non-disjunction or lagging of certain bivalents which is frequently met with in literature, would be explained by assuming the non-uniformity in time co-ordination of the two component parts of the chromosome in individual bivalents within the same cell.

§ The present observations have an important bearing upon the relationship between somatic mitosis and meiosis. The results seem

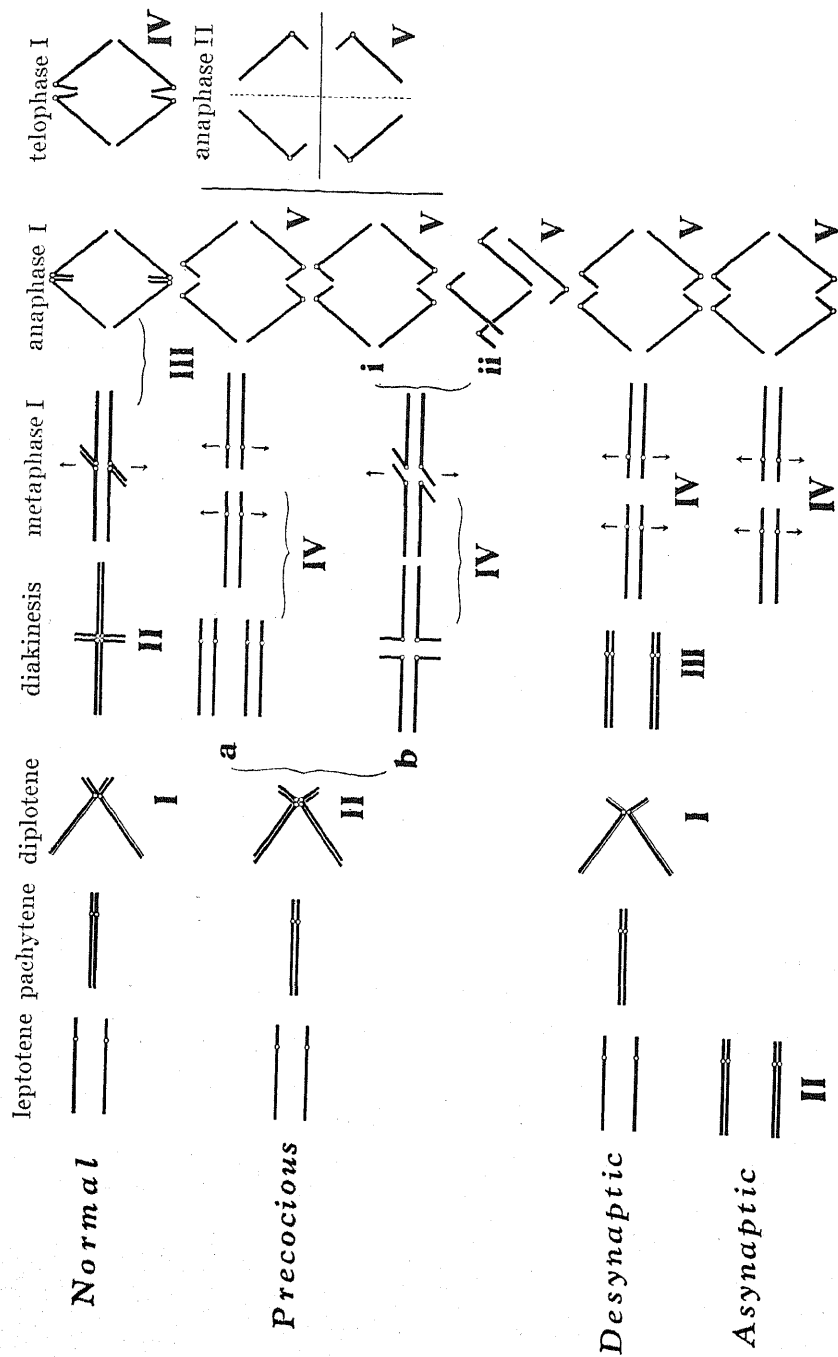


Diagram 1. Schematic representations of normal, precocious, desynaptic and asynaptic types of meiosis. Numerals, I, II, III etc. indicate the corresponding stages of the kinetochore in these forms.

to indicate that the kind of abnormality is determined by the point in time at which the stimulus is exerted which causes the prophase begin. The earlier the point of this exertion is, the more precocity in the time co-ordination of the behavior of the kinetochore and of the rest of the chromonemata is expected. Thus in view of the behavior of the kinetochore, *viz.*, the two successive separations of the associated kinetochores, the normal metaphase condition may be said to have been shifted up to diakinesis in desynaptic material and to the diplotene stage in precocious. In an asynaptic case, the division of the kinetochore takes place rather early, with the consequence of preventing the association of the homologous kinetochores. These relations are illustrated in Diagram 1. Such a consideration suggests that the somatic mitosis differs from meiosis in the time of division of the kinetochore and supports Darlington's hypothesis ('31) correlating meiosis and mitosis (precocity hypothesis) or Huskins' modification of it ('32, retardation hypothesis), though the present observations suggest that the splitting of the kinetochore occurs in asynaptic material in the last premeiotic division (Huskins) rather than in prophase of meiosis (Darlington).

§ The characteristic metaphase configuration of the four chromatids constituting a bivalent in the 'precocious-b' type is of significance in considering the forces acting upon the chromosomes during their separation at this stage. It is an interesting fact that only in this abnormal type is the chromatid distribution to the poles very often irregular, the four associated chromatids segregating 2-2 sometimes, and 1-3 at other times, whilst in all other cases recorded in the present paper including the normal meiotic case the chromosome separation is regularly 1-1. It is highly probable that such differences in chromosome behavior are attributable to differences in the orientation of the associated kinetochores of a paired chromosomes in relation to the spindle.

In the normal bivalent (including the paired chromatids in other abnormal types), its two kinetochores come to constitute a repulsion system within the pellicle at the time of their division early in the stage of meiosis (probably diplotene). This implies that the repulsion force originates between the pair of paired kinetochores, as in the other part of the chromonemata (*cf.* Huskins '32). If the electromagnetic interpretation of chromosome behavior is admitted (*cf.* Kuwada & Sugimoto '28, Kuwada '29, Wilson '33, Koller '34), the chromosomes at diakinesis repel each other, being of the same negative charge, and at prometaphase after the disappearance of the nuclear membrane the poles with the same charge also repel the chromosomes, forcing them towards the equator. At the metaphase

plate the chromosomes change their charges probably owing to positively charged portion of the cytoplasm at this region, causing then an attraction between the chromosomes and the poles. It will be considered then that the two kinetochores (exactly, the pair of paired kinetochores) within the pellicle come to orientate themselves along the line of polar attraction in order to reduce the potential energy of the system. The point of attachment with the plasma (the so-called 'polar granules') will, consequently, in direction be in accordance with the polar axis. Diagram 2a represents such a condition. The consequence will be the 1-1 distribution of the kinetochores along the poles.

In cases of trivalents where the three kinetochores lie within the same pellicle, their orientation on the equator in relation to the polar axis will be of a triangle form as illustrated in Diagram 2b. The result will be the distribution of 2-1 for each trivalent, a condition fully ascertained by Haga ('37) in triploid *Paris* and explained on the same basis.

The same principle of the axial orientation and mutual repulsion of the associated kinetochores will be applicable to the 'precocious-b' type where the four daughter kinetochores lie separately within the same pellicle. Such a case would be taken as representing also the case of quadrivalents. Here two cases of orientation of the kinetochores may be considered to take the form as represented in Diagram 2c and 2d.¹⁾ In the former type of arrangement, the separa-

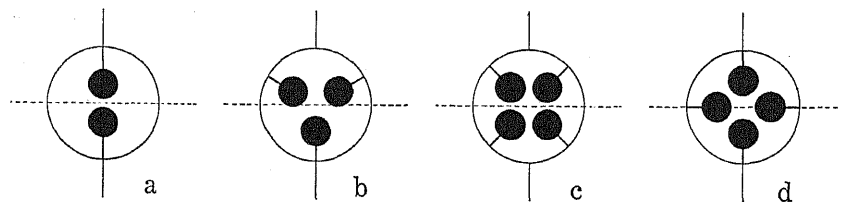


Diagram 2. Schematic representation of the orientation of the kinetochores at metaphase in cases of 2 (a), 3 (b) and 4 (c and d) kinetochores lying within the same pellicle. Black circles represent kinetochores; vertical line, polar axis; horizontal line (dotted), equator.

tion of the kinetochores will always be 2-2, whilst in the latter it is either 2-2 or 3-1, the two kinetochores lying along the equator being neutral with respect to the polar attraction and therefore only passively driven towards the pole at the beginning of their separation as will be seen in Text-fig. 19, until they adjust themselves later to the spindle mechanism. It is difficult to say which type of these arrangements is more stable, but the observed frequency of mother-

1) Instead of these two-dimensional arrangements, there are also corresponding tetrahedral ones, but the spatial relationships of the kinetochores with each other remain the same.

Table 1. Distribution of chromatids in the 'precocious-b' type

Modes of division	10-10	11-9	12-8	13-7	14-6	15-5	Total
Frequency, observed	40	17	9	0	0	0	75
Do., in %	65.33	22.67	12.00	0	0	0	100.00
Do., expected	<u>62.30</u>	<u>20.51</u>	<u>11.72</u>	<u>4.40</u>	<u>0.98</u>	<u>0.10</u>	<u>100.01</u>

cells in respect to the modes of distribution of the twenty chromatids (10-10, 11-9 and 12-8) seems to indicate that both the arrangements occur equally, as inferred from Table 1 where the observed data are compared with the expected values calculated on this basis.

Summary

1) The subjection of *Trillium* plants to high temperature prior to the meiotic divisions has produced several abnormalities upon meiotic chromosomes which were distinguishable into two categories, (i) concordant and (ii) discordant.

2) The concordant anomalies are dependent upon the balanced acceleration rates of the behavior of the kinetochore and of the rest of chromonemata. They are different from the control merely in the dimensions of chromosomes and of entire mother-cells, but quite normal in the mode of bivalent formation and the subsequent behavior of chromosomes.

3) The discordant anomalies are dependent upon the upsets in timing relationships between the kinetochore and the other part of the chromonemata. The consequences are (i) the occurrence of 10 univalents at the first metaphase, which is due to either (a) complete failure of synapsis (asynapsis) or (b) premature separation of the associated kinetochores (desynapsis) and (ii) the occurrence of 10 'dyads' each consisting of two separated chromatids lying parallel ('precocious-a') or 5 'tetrads' each consisting of four chromatids associating in cruciferous forms ('precocious-b'). These are illustrated in Diagram 1.

4) The significances of the kinetochore in the meiotic divisions are discussed in connection with the relationship between mitosis and meiosis and with the forces acting upon the kinetochore at metaphase.

Literature Cited

- Darlington, C. D., 1931. Meiosis. *Biol. Reviews*, 6: 221-264.
Haga, T., 1937. Karyotypic polymorphism in *Paris hexaphylla* Cham., with special reference to its origin and to the meiotic chromosome behavior. *Cytologia* (in the present volume).
Heilborn, O., 1930. Temperatur und Chromosomen-Konjugation. *Svensk. Bot. Tidskrift*, 24: 12-25.
Huskins, C. L., 1932. Factors affecting chromosome structure and pairing. *Trans. Roy. Soc. Canada, Section V.*: 1-12.
Katayama, Y., 1931. Variation in the number of bivalent chromosomes in the F_1 hybrids between *Triticum durum* and *Aegilops ventricosa*. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 45: 424-445.

- Koller, P. Ch., 1934. The movements of chromosomes within the cell and their dynamic interpretation. *Genetica*, 16: 447-466.
- Kuwada, Y., 1929. Chromosome arrangement. I. Model experiments with floating magnets and some theoretical considerations on the problems. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ., Ser. B.*, 4: 199-264.
- and T. Sugimoto, 1928. On the staining reactions of chromosomes. *Protoplasma*, 3: 531-534.
- Matsuura, H., 1935 a. Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* Pall. I. *Cytologia*, 6: 270-280.
- 1935 b. do. II. *Jour. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Ser. V*, 3: 233-250.
- do. III. *Cytologia* (in the press).
- do. IV. *Cytologia* (in the press).
- 1936. The chromomere and its critique (A preliminary note). (in Japanese) *Jap. Jour. Genetics*, 12: 38-40.
- Nakamura, M., 1936. Experimental and cytological studies on the instability of the meiotic division of the pollen mother cells of *Impatiens Balsamina* Linn. caused by the effect of high air temperature. *Mem. Fac. Sci. & Agr., Taihoku Imp. Univ.*, 12: 121-183.
- Oehlkers, F., 1935. Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis I. *Zts. f. Bot.*, 29: 1-53.
- Sakamura, T., u. I. Stow, 1926. Über die experimentell veranlaßte Entstehung von keimfähigen Pollenkörnern mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Jap. Jour. Bot.*, 3: 111-137.
- Shimotomai, N., 1927. Über Störungen der meiotischen Teilungen durch niedrige Temperatur. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 41: 149-160.
- Stow, I., 1927. A cytological study on pollen sterility in *Solanum tuberosum* L. *Jap. Jour. Bot.*, 3: 217-238.
- Straub, J., 1936. Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis II. *Zts. f. Bot.*, 30: 1-57.
- Takagi, F., 1928. The influence of higher temperature on the reduction division of the pollen mother-cells of *Lychnis Sieboldii*, van Houtte. *Sci. Rept., Tohoku Imp. Univ., Ser. 4*, 3: 461-466.
- Wilson, E. B., 1933. Metaphase patterns. *Jour. Morph.*, 51: 357-389.

Explanation of Plates

All the photomicrographs were taken by the writer from acetocarmine smear preparations with the lens combination of Leitz $\times 45$ with Zeiss Homal III (giving a magnification of 747).

Note that in the following explanations of abnormal meiotic forms a terminology based on the normal meiotic process was used—merely a matter of convenience.

Plate 1

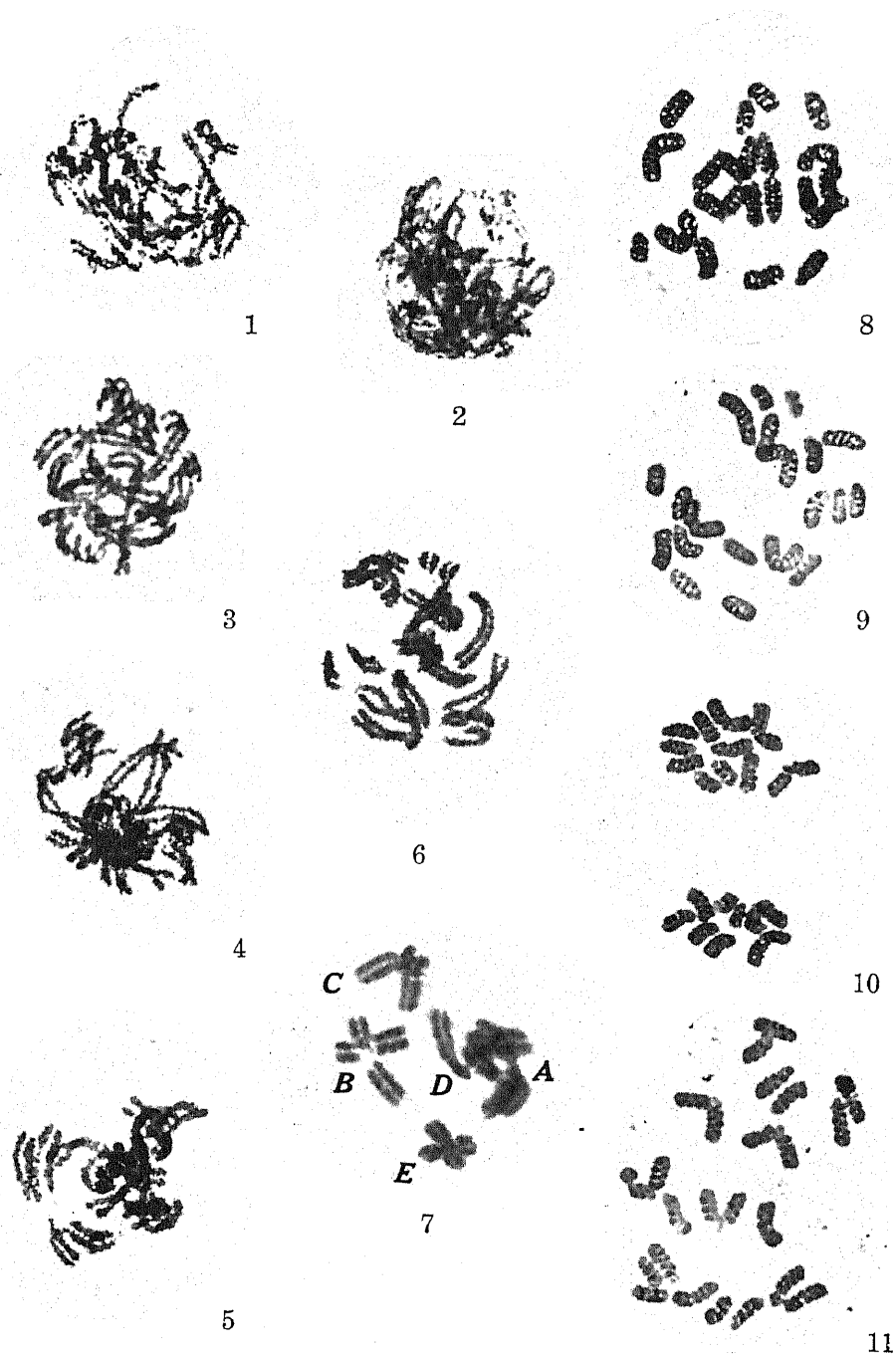
'Precocious'

Fig. 1, Pachytene. Fig. 2, Beginning of separation of paired chromonemata. Fig. 3, Completion of separation of paired chromatids. Fig. 4, Early 'diplotene'. Fig. 5, Mid-'diplotene'. Fig. 6, Late 'diplotene'. Fig. 7, 'Diakinesis'; the five members of the complements (A-E) are distinguishable. Fig. 8, Side view of early anaphase I. Figs. 9-11, Distribution of chromatids in 10-10 (Fig. 9), 9-11 (Fig. 10) and 8-12 (Fig. 11).

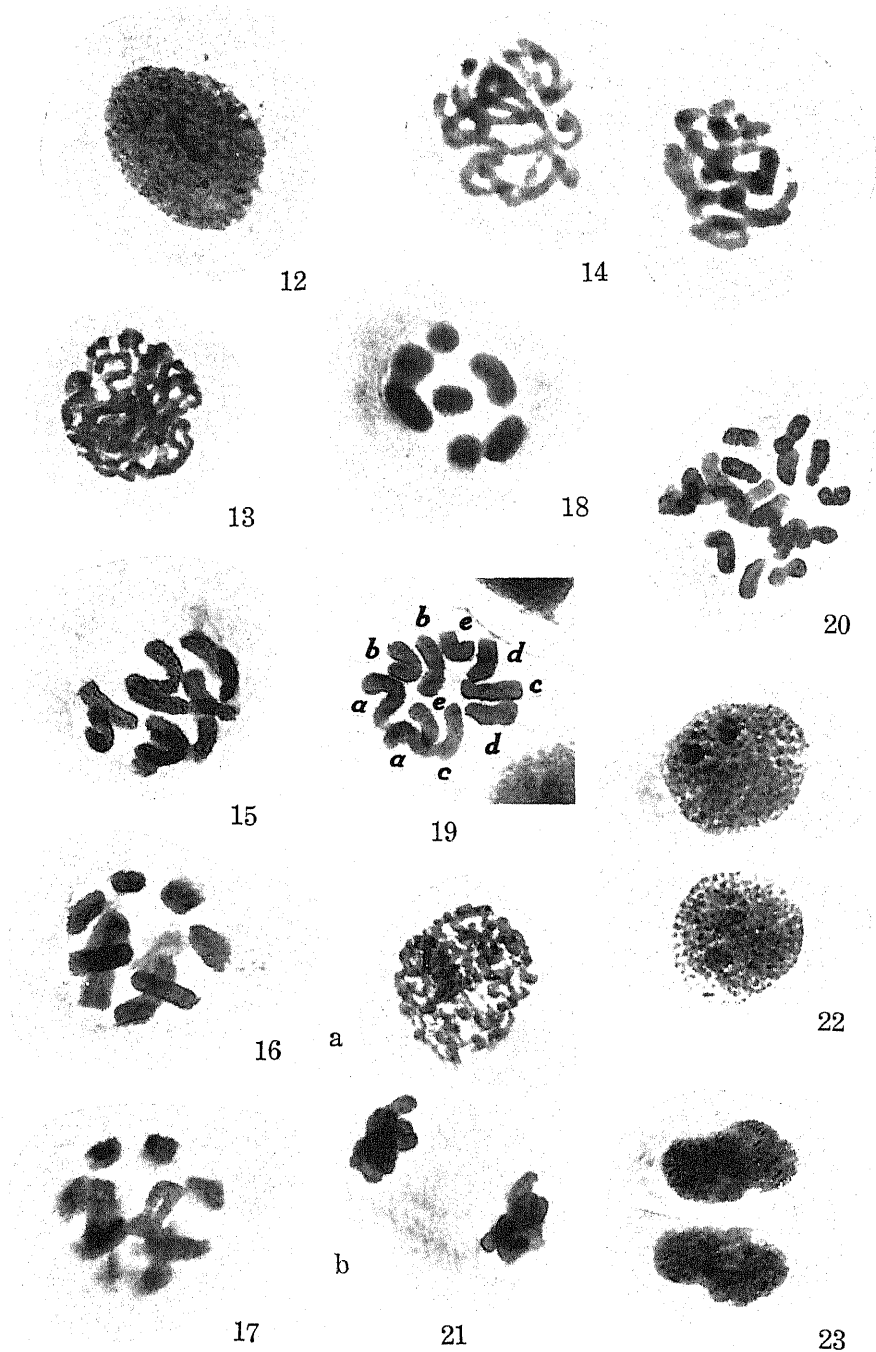
Plate 2

'Asynaptic'

Fig. 12, Resting stage. Figs. 13 and 14, Formation of spiremes. Fig. 15, Appearance of 10 univalents at 'diplotene'. Figs. 16 and 17, Early 'diakinesis' (taken under two different foci). Fig. 18, Late 'diakinesis'. Fig. 19, 'metaphase I'; the chromosome individuals are distinguishable. Fig. 20, Early anaphase. Fig. 21, Showing the disturbance in the synchronization of the division; one (a) of the two cells lying side by side is at early prophase, while the other (b) is already at late anaphase. Fig. 22, Formation of dyad cells. Fig. 23, Formation of tetrad nuclei.



Matsuura: Chromosome Studies on *Trillium kamschaticum* Pall.
V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature



Matsuura: Chromosome Studies on *Trillium kamtschaticum* Pall.
V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature



Elektrische Ladungen des gesunden und kranken Cytoplasmas

Von

Rudolf Keller

Arbeiten der Prager biolog.-physik. Arbeitsgemeinschaft

Wer sich mit der Vitalfärbung tierischer und pflanzlicher Zellen beschäftigt, macht die Erfahrung, daß sich Zellen und Gewebe, die durch äußere oder innere Einwirkung eine Schädigung erleiden oder in ihrer Atmung behindert sind, schlechter färben lassen als normale Zellen, zumindest mit den basischen eigentlichen Vitalfarbstoffen. Diese Beobachtung ist schon sehr alt und von den verschiedensten Untersuchern bestätigt, in unserem Laboratorium von J. GICKLHORN. Unabhängig davon, haben die Elektrophysiologen festgestellt, daß die Krankheiten, Schwächezustände oder behinderte und fehlende Atmung die elektrischen Potentiale der tierischen Gewebe stark beeinträchtigen oder ganz verschwinden lassen. In den letzten Jahren hat insbesondere IWAO MATSUO¹⁾ mit zahlreichen Mitarbeitern ausgedehnte Untersuchungen über Farbstoff-Resorption in gesunden und kranken Tieren und Menschen unternommen, welche gezeigt haben, daß die alten Regeln nicht genau stimmen und daß unter Umständen kranke und tote Gewebe Farbstoffe auch besser aufnehmen als gesunde. Ganz abgestorbene Gewebe nehmen oft basische und saure Farbstoffe widerstandslos auf.

Sehr interessante und neuartige Ergebnisse über Färbung tierischer Gewebe erzielte in neuester Zeit die Klinik EPPINGER in Wien, welche die modernsten mikroskopischen Methoden benützte, vor allem die Beobachtung im ultravioletten Licht mit fluoreszierenden Farbstoffen, welche die Anwendung der stärksten und unschädlichsten Verdünnungen gestattet. EPPINGER hat diese von F. P. FISCHER ferner von ELLINGER und HIRT geschaffenen qualitativen Methoden zu quantitativen ausgebaut, indem er die Zeiten des Eindringens notierte und gleichzeitig parallel an denselben Objekten mittels Mikroelektroden die Veränderung der elektrischen Potentiale feststellte und die Bewegungen der Mineralien analysierte.²⁾ Es ergab sich bei diesen ausgedehnten Versuchen, daß die elektrischen Kräfte der Zellen bei der Vitalfärbung und bei der Einwanderung und Auswanderung der Mineralien sich in gleichsinniger Weise verschieben, die Speicherorgane, die Muskeln, das Herz verlieren bei den meisten Erkrankungen an Elektropositivität, während das Serum

an Elektronegativität verliert. Eine merkwürdige Beobachtung ergab sich in EPPINGERS Versuchen bei der Einwirkung der gebräuchlichen Fieber- und Herzmedizinen (Pyrazolone z.B. Pyramidon, Antipyrin, ferner Digitalis, Strophantin, Chinin u.a.), nämlich daß diese nicht nur wieder den normalen Zustand in Millivolt, in Kali- und Natriumsalzen, in der Vitalfärbung herstellen, sondern sehr oft darüber hinausgingen und Rekordzahlen an Millivolt, und an Aschengehalten produzierten, die höher waren als die normalen.

Wer gewohnt ist, cytoplasmatische Strukturen lebend zu färben, wird sich daran erinnern, daß Ähnliches bei den verschiedensten Tieren und Pflanzen beobachtet werden kann. So zum Beispiel schildert MATSUOS Schüler TEJIMA in dem eingangs zitierten Werke nach Beobachtungen an Typhuskranken im Rekonvaleszenten-Stadium, daß die während des Krankheitsstadiums verminderte Farbstoff-Resorption im Darm während der Heilung stärker ist als normal. Dieselbe Autorengruppe hat auch zahlreiche Magen-gesunde und Magenkranke untersucht, wobei es sich immer ergeben hat, daß die Säureausscheidung des Magens (deren Ursprungsort das Cytoplasma der Belegzellen ist) parallel geht der Ausscheidung der basischen Farbstoffe, ebenfalls aus dem Cytoplasma der Belegzellen.

Man beachte, daß das Protoplasma der lebenden Zellen eine chemische Tätigkeit ausübt, die grundverschieden ist von allen gewohnten chemischen Vorgängen im anorganischen Laboratorium, es zieht aus der Umgebung gewisse Stoffe an und stößt gewisse Stoffe ab, wobei es sich nicht nach den gewohnten chemischen Gruppen richtet, nicht etwa Säuren anzieht und Basen abstößt, sondern gewisse Säuren und gewisse Basen aussondert und in Strukturen des Plasmas konzentriert, andere Säuren und andere Basen eventuell an anderen Punkten des Cytoplasmas anhäuft. Diese Gruppierungen sind seit fünf Jahrzehnten von genauen Analysatoren beobachtet worden, sie sind als „Säftesalze“ und „Gewebsalze“ seit 1875 (FORSTER) von den verschiedenen Autoren gefunden, immer wieder neu entdeckt und beschrieben worden. Diese wichtige Tatsache hat man sich immer vor Augen zu halten, wenn man über die auswählende Kraft des Cytoplasmas Untersuchungen anstellt. Seit einigen Jahren hat es sich ergeben, daß diese beiden Stoff-Gruppen in der elektrischen Hochspannung entgegengesetzt geladen sind und in entgegengesetzter Richtung wandern. Fast alle Neutralkolloide und Komplexe, ferner die weitaus meisten Neutralmoleküle gehen in der Zelle zum positiven Pol, dazu einige schwache Säuren, im ganzen vielleicht 90 oder 95% aller bekannter Substanzen, nur

einige wenige, aber unter ihnen sehr wichtige Stoffe, das Wasser, das Kochsalz, die Lithiumsalze, die ionisierten Calciumsalze, der ionisierte Teil der Eisenverbindungen die meisten sauren Farbstoffe gehen im Cytoplasma an die negativen Strukturen.

Von dieser empirischen Regel machen auch die Kalikomplexverbindungen, oder die des Rubidiums und Cäsiums, die in Ionenform an der Spitze der positiven Spannungsreihe stehen, keine Ausnahme. Wer auch nur einige Vertrautheit hat mit cytoplasmatischen Strukturen, weiß aus Erfahrung, daß Säureorte und basische Farbstoffe immer an identischen Punkten des Protoplasmas angetroffen werden, an diesen Punkten sitzen auch Kalium, Phosphate, Ammoniak Glykogen, Stärke, und viele andere Stoffe.

Das normale und gesunde Protoplasma häuft an diesen elektropositiven Punkten erfahrungsgemäß die stärksten Säuren an zusammen mit einigen der stärksten Basen, das kranke Protoplasma verliert graduell mit dem Fallen der elektrischen Potentiale die Fähigkeit aus neutraler Umgebung Säuren zu erzeugen gleichzeitig und in demselben Grade, in dem es die Fähigkeit verliert, Kalium aus kaliarmer Umgebung zu konzentrieren. Bei den menschlichen Kranken ist es längst feststehend (zuerst von GLAESSNER 1926 beobachtet), daß viele von ihnen weniger oder keine Säure in den Magen sezernieren zugleich mit dem Nachlassen der Fähigkeit, Farbstoffbasen (Methylenblau, Neutralrot) in den Magen auszuscheiden. Später hat VISSCHER gezeigt, daß auch die stärkste Base, Kali, keine Ausnahmen von dieser Regel macht und parallel mit der Salzsäure aus der kaliarmen Lymphe Kalium im Magen angereichert wird. Wer sich mit dem Stoffwechsel des Cytoplasmas befaßt, muß sich diese scheinbar paradoxen Tatsachen, die den Gesetzen der physikalischen Chemie keineswegs widersprechen, fest einprägen. Man muß im Auge behalten, daß mikroskopisch dünne Cytoplasma-Filme eine merkwürdige Fernwirkung ausüben, die in der jüngsten Zeit genauer studiert wird. Versuche der Erklärung dieses scheinbar paradoxen Verhaltens des lebenden Protoplasmas findet man in den Schriften des Verfassers³⁾. Nicht in allen Fällen sind diese Erklärungen voll befriedigend. In diesem Aufsätze sollen hauptsächlich jene Tatsachen hervorgehoben werden, die den üblichen Verallgemeinerungen zu widersprechen scheinen. Durch Versuche im elektrischen Hochspannungsapparat von R. FÜRTH hat sich in der Mehrzahl der Fälle durch J. GICKLHORN, später durch WAELSCH und KITTEL demonstrieren lassen, daß in Gegenwart eines Überschusses von Biokolloiden eine allgemeine Tendenz der Kolloidkorpuskel und Moleküle besteht, sich von Partikeln entgegengesetzter elektrischer Ladung adsorbieren zu lassen und dann entgegen

der Erwartung im elektrischen Feld nach der umgekehrten Richtung zu wandern, als sie nach ihrem eigenen Ladungssinn zu gehen hätten.

Wir kehren jetzt zu unserem Tatsachenbericht über das Verhalten des Cytoplasmas lebender Zellen gegenüber eindringenden Stoffen zurück.

Auf einem ganz anderen Wege und ohne Rücksicht auf elektrische Erscheinungen, ohne die die meisten Pflanzenphysiologen und -morphologen auskommen zu können glauben, hat kürzlich SCHUMACHER⁴⁾ an den Staubfadenhaaren von *Tradescantia* gezeigt, daß beim Eindringen gewisser Stoffe das Cytoplasma der Zelle eine viel größere Rolle spielt—SCHUMACHER glaubt: die einzige Rolle—als die Membran oder die Grenzschicht des Protoplasmas. Er sagt: Ausschließlich von der lebenden Substanz und ihrem „regulativen Walten“ hängt ab, ob der Stoff von Zelle zu Zelle weitergegeben wird. Zu diesem Schlusse, der vielleicht in dieser scharfen Form nicht für alle Zellen und Membranen gelten mag, kam der genannte Pflanzenforscher durch genaue mikroskopische Beobachtung der Fluorescein-Einwanderung in die Staubfadenhaare im ultravioletten Licht. Er zeigte, daß der Farbstoff, der in Milliardstel-Verdünnung im kurzwelligen Licht noch gut sichtbar ist, die Membran ganz dunkel läßt und erst im Cytoplasma der nächsten erreichten Zelle wieder so weit festgehalten und angehäuft wird, daß er sichtbar wird. Da er in die Zelle auf keinem anderen Weg als durch die Membran eindringen kann, so passiert er diese entweder in so großer Schnelligkeit oder in so minimaler Verdünnung, daß er die Sichtbarkeitsgrenze nicht erreicht. Bei der mikroskopischen Beobachtung solcher dunkler Membranen sieht es so aus, als ob der leuchtende Farbstoff durch die Membran gleichsam durchgeschossen werden würde.

Man erkennt, daß die Beobachtung von grundlegender Wichtigkeit ist für die Wanderung aller Moleküle zwischen lebenden Zellen. Man kann, wenn man gewohnt ist, mit den stark verdünnten Lumineszenzfarbstoffen zu mikroskopieren, solche Beobachtungen öfter machen. Der erste, der mit Fluorescein im ultravioletten Licht arbeitete, PAUL EHRLICH, war 1890 überrascht davon, wie scharf und plötzlich das Fluorescein als leuchtende Linie auf dunklem Grund erscheint, und jeder heutige Experimentator macht diese Beobachtung aufs Neue. Bei Tieren, deren Zellen auf mehreren Wegen zugänglich sind, ist die Anhäufung auf elektronegativen Punkten nicht immer so eindeutig zu übersehen wie in SCHUMACHERS Versuchen, der eine Fluorescein-Gelatine an die Basis des Haares brachte, das aus wenigen einzelnen Zellen besteht, die eine hinter der andern liegen, was den Vorgang besonders klarmacht. Wenn

er die Fluorescein-Gelatine an die Spitzenzelle des Haares anlegte statt an die Basiszelle, so hat dieselbe Zellgrundsubstanz und dieselbe Membran den Farbstoff nicht eingelassen, sondern abgelehnt. Es sitzt also im Cytoplasma der Zellen, die einzeln eine auf der andern liegen, der Gradient einer Vektorkraft, die nur in bestimmter Richtung, von der Zellbasis zur Spitze anzieht, in der entgegengesetzten Richtung aber denselben Farbstoff abstößt.

Die Experimentatoren, die die stark verdünnten Luminiscenzfarbstoffe beobachteten, kommen schließlich zu der Überzeugung, daß in der lebenden Zellmasse Kräfte sitzen, die durch die Grenzschichten und Membranen hindurch bestimmte Stoffe anziehen und bestimmte Stoffe abstoßen. Die Anerkennung der Abstoßungskraft hat sich noch nicht durchgesetzt, da das Tatsachenmaterial, das diese grundwichtige Zellkraft demonstriert, bisher von den Wenigsten gekannt wird, die Cytologen auch das Luminiscenz-Mikroskop noch viel zu wenig kennen oder selber benützen und sich der Methode nicht bedienen, die besonders geeignet sind, alte Streitfragen zu klären und zwecklosen, weil auf nicht genügender Kenntnis des Tatsachenmaterials beruhenden Diskussionen ein Ende zu machen.

Der Gedanke, daß Membranen und Grenzschichten allein es sind, die besonders starke Kräfte erzeugen, seien diese nun elektrischer, chemischer oder elektrochemischer Natur liegt weit ab von den Haupttatsachen der Lebenstätigkeit. Wenn es so wäre, so müßten die Tiere Säuren oder Basen verzehren und die chemischen und elektischen Potentiale bei der Berührung in andere Energien umsetzen. Die Wirklichkeit ist eine ganz andere. Die Tiere verzehren zu 99 Prozent Neutralstoffe (deren Hauptkennzeichen ihre Oxydierbarkeit ist), vertragen weder starke Basen noch starke Säuren und zerlegen die ihnen zukommenden Neutralsalze bei der ersten Begegnung im Magen mit beträchtlichem Energieaufwand in Salzsäure und Natron. Auch die Pflanzen verhalten sich sehr ähnlich, indem sie aus den Neutralsalzen des Bodenwassers oder des Meeres, in der Umgebung der Wurzel und in ihren Millionen Vakuolen stark saure und kalireiche Lösungen aus Neutralsalzen produzieren. Das Protoplasma ist also in den Hauptperioden seiner Tätigkeit nicht neutralisierend, es ist vielmehr seine Hauptarbeit, aus elektro-neutralem und chemisch neutralem Milieu starke Säuren und Basen, starke negative und positive Potentiale, hervorzubringen. Es liegt auf der Hand, daß eine tote Membran oder eine Grenzschicht allein zu dieser Leistung unfähig ist und daß das Cytoplasma der Hauptträger der elektrischen und chemischen Energiewirkung sein dürfte, die, wie man mit LUND, WURMSER,

KOLLATH u.a. annehmen darf, durch einen Oxydationsprozeß in dem atmenden Protoplasma der Zellgrundmasse unterhalten wird.

Daß es sich hier um eine Regel von allgemeiner Bedeutung handelt, läßt sich leicht an pflanzlichen Vakuolen nachweisen, die in besonders genauer Weise von dem OSTERHOUT-Laboratorium in den riesigen Einzelzellen der Algen *Valonia*, *Halicystis*, *Nitella* analysiert worden sind. Die Tiercytologen bringen diesen interessanten Untersuchungen nur ein sehr geringes Interesse entgegen, obwohl sie Regeln über den Zellstoffwechsel enthüllen, die für Tiere ebenso gelten wie für Pflanzen. Diese zentimetergroßen Einzelzellen bestehen aus Cellulose-Gerüsthüllen, die für unser Problem bedeutungslos sind, und an welchen eine etwa 1/100 mm dünne Cytoplasmaschicht mit zahlreichen Kernen und Chlorophyllkörpern vorbeifließt, die eine große Saftvakuole einschließt, deren Inhalt genau analysiert werden kann. Diese fabelhaft dünne Schicht produziert —ähnlich wie die Belegzelle des Magens aus der alkalischen Lymphe —aus dem alkalischen Meerwasser starke Säuren, sie reichert den Kaligehalt der Saftvakuole auf das Zehnfache bis Sechzigfache des Meerwassers an, sie akkumuliert basische Farbstoffe und stößt saure Farbstoffe ab, sie stößt die Natriumsalze des Meerwassers ab, eine ganz erstaunliche Leistung eines mikroskopisch dünnen Cytoplasmafilms, der in den Wogen der Meeresbrandung hin- und hergerissen wird.

Sie hat noch viele andere Ähnlichkeiten mit dem tierischen Protoplasma der Speicherorgane. Wenn die Zellen durch eine verdünnte 1/200 normale Ammoniumchloridlösung ein wenig geschädigt werden, so geht nicht nur die Säure der Vakuole und der Kaliumgehalt zurück, es dringen Natrium und Chlor ein, ebenso Wasser, also die biologisch elektronegative Gruppe geht heraus und die biologisch elektropositive wird weniger stark abgestoßen genau wie bei einer kranken Leber oder einem kranken Herzen, die anschwellen und Kochsalz einlassen. JACQUES und OSTERHOUT⁵⁾ schädigten die Süßwasseralge *Nitella* durch dreitägigen Aufenthalt in destilliertem Wasser und verzeichneten die Gehalte der Vakuolen an Kalium. Sie fanden normal 0,056 Mole Kalium, in den geschädigten Pflanzen nur mehr 0,033 K, in den in Lösung mit 0,001 mK zurückgebrachten Pflanzen aber 0,078 mK. Die dünnen Cytoplasmafilme verhielten sich also ähnlich wie die Gewebe der Patienten in EPPINGERS und MATSUOS Klinik. Sie produzierten während der Erholung größere Kaliumvorräte als die normalen Pflanzen.

Im Nachstehenden seien zwei bisher unveröffentlichte Versuchsprotokolle an Salamandern von KAUNITZ und SCHÖBER aus der Wiener I. Mediz.-Univers.-Klinik wiedergegeben. (Allylformiat ist ein Gift,

mittels dem nach der Methode EPPINGERS Oedeme jedes gewünschten Grades sich erzeugen lassen, Novalgin ist ein injizierbares Pyrazolon-Derivat (Phenyl-dimethylpyrazolon-methylaminometasulfosaures Natrium), das injizierbar ist und rasch wirkt:

Potentiale I.			II.		
Zeit	Leber (eingestochen) gegen Leitungswasser	Vena cava außen	Zeit	Leber	Vena cava
10 ³⁵ normal	+30	+42	21 ¹⁰	+ 36	+ 48
10 ³⁵ Oedemgift	20 mg Allylformiat,	intra-cardial	21 ¹²	10 mg Novalgin	+30 mg Allylformiat
10 ⁴⁰	+30	+30	21 ¹⁵	+ 58	+ 70
10 ⁴⁵	+30	+30	21 ³⁵	+ 96	+ 96
10 ⁵⁵	+30	+30	21 ⁵⁰	+114	+114
11 ⁰⁵	+26	+30	22 ⁰⁵	+ 78	+ 84
11 ¹⁵	+24	+24	22 ²⁰	+ 96	+ 96
11 ³⁰	+12	+20	22 ³⁵	+108	+108
11 ⁴⁵	+10	+18	22 ⁵⁰	+ 84	+ 96
12	+ 8	+18	Tier lebt, wird nach 1 Stunde getötet.		

Erstaunlich hoch, aber in zahlreichen anderen Versuchen an Säugetieren bestätigt sind die hohen Potentiale nach Novalgin trotz der 30 mg Gift! KAUNITZ hat an Säugetieren die Mineralgehalte von Herz und Leber nach Pyrazolon-Eingabe analysiert und für Kalium erhebliche Überschüsse über den Normalgehalt und für Natrium andere, meist höhere Ziffern gegenüber dem Normalgehalt festgestellt. Auch in Prag sind an anderen Objekten ähnliche Abweichungen vom Normalgehalt gefunden worden. Es scheint sich hier um eine sehr verbreitete Eigenschaft des gesunden und des erkrankten Protoplasmas zu handeln.

Über die chemischen Leistungen des lebenden Cytoplasmas in normalem und im kranken Zustande können wir nunmehr zusammenfassend folgende Regeln aufstellen:

1. Das Protoplasma der lebenden Zelle sondert die ihm aus der Umgebung angebotenen Stoffe nach zwei Hauptgruppen, zieht die eine biologisch entgegengesetzt geladene Gruppe an und stößt die gleichnamig geladene Gruppe ab.
2. Schädigung, Krankheit, Infektion vermindern das charakteristische elektrische Potential des Cytoplasmas. Auch die Anziehungskraft und die Abstoßungskraft wird herabgesetzt.
3. Während der Rekonvaleszenz wird öfter sowohl bei Tieren als bei Pflanzen ein abnorm hohes Potential beobachtet, ebenso höhere Gehalte an der einen Stoffgruppe und niedrigere an der antagonistischen Gruppe.

Literaturverzeichnis

- 1) I. Matsuo. Biologische Untersuchungen über Farbstoffe, 1935 II. Band.— Die Einzelarbeiten erschienen in den Jahren 1928 bis 1934 in den Zeitschr. Kyoto Igaku-Zasshi, Jap. Jour. of Gastroenterology und anderen Zeitschriften.
- 2) Prof. H. Eppinger und seine Mitarbeiter Assistent Dr. H. KAUNITZ und Dr. SCHÖBER haben mir gestattet, für die Festschrift zum 70. Geburtstag Prof. FUJII's einiges unveröffentlichtes Material aus seinen Ergebnissen zu veröffentlichen. Die Arbeiten von KAUNITZ und Mitarbeitern erscheinen 1937 in der „Zeitschr. für klin. Med.“ und in den „Ergebnissen d. inn. Med.“
- 3) R. Keller. Elektr. Faktor der Ernährung, Berlin, S. Karger, 1936. Arch. de physique biol. 11, 1, 1933 Mediz. Klinik 1934 Nr. 11, Nr. 38, Protoplasma 25, 69, 1936. Arch. f. exp. Path. 183, 509, 1936.
- 4) Schumacher. Jahrb. f. wissenschaft. Bot. 82, 517, 1936.
- 5) A. G. Jacques and W. J. V. Osterhout. Journ. of. Gen. Physiol. 18, 967, 1935. Dasselbst und in fast allen Heften des J. o. g. Ph. Zitate der übrigen Untersuchungen des Laboratoriums.

Chromosome Aberration and Gene Mutation in Sticky Chromosome Plants of *Zea mays*

By

G. W. Beadle

California Institute of Technology, Pasadena, California

INTRODUCTION

The present paper reports an extension of studies of the chromosome abnormality in maize known as "sticky chromosomes" (Beadle, 1932). Preliminary studies indicated an increased mutation rate and a relatively high incidence of chromosome rearrangements in sticky chromosome plants. More extensive studies to be reported here confirm these indications of the preliminary tests.

The studies previously reported show that the character sticky chromosomes is differentiated from normal by a gene (*st*) located in chromosome 4 and lying some 12 units from the sugary endosperm gene (*su*). It has since been shown that the serial order of the genes *su*, Tunicate (*Tu*), and glossy-3 (*gl₃*) is *su-Tu-gl₃* (Emerson, Beadle, and Fraser, 1935); the linkage data involving *st* (Beadle, 1932) therefore show that the order of the four genes is *st-su-Tu-gl₃*.

The phenotypic characteristics of sticky chromosome plants have been described. Meiosis is characterized by extensive general sticking together of chromosomes. At anaphase of both the first and second meiotic divisions chromosomes are visibly attenuated and fragmented. Root tip mitoses are less strikingly aberrant, but it has been demonstrated cytologically that fragments and losses of whole chromosomes are relatively frequent (Beadle, 1932).

SPOROPHYTE MOSAICS

Method

For the purpose of detecting genetically the loss of chromosomes or chromosome fragments during somatic mitoses in sticky chromosome plants, the plant color genes *a* (chromosome 3), *B* (chromosome 2), and *Pl* (chromosome 6) were made use of. Plants of the constitution *st*, *A/a*, *B/b*, *Pl/pl* were obtained from crosses of *St/st*, *a*, *B*, *Pl* by *St/st*, *A*, *b*, *pl* plants. As controls, sibs from the same crosses but of the constitution *St/St* (or *St/st*), *A/a*, *B/b*, *Pl/pl* were used. The loss of the dominant allelomorph of any one of the three genes, *a*, *B*, or *Pl* could be detected as a sector

different in color from surrounding tissues. According to the scheme of interaction of these genes worked out by Emerson (1921), the phenotype of the normal tissue and tissue resulting from division of cells which had lost one of the dominant allelomorphs of the three color genes should be as follows:

$A B Pl$, intense purple
 $A B pl$, intense red
 $A b Pl$, dilute purple
 $a B Pl$, brown.

Losses of any two or all three dominant allelomorphs should give tissues of phenotypes which in small sectors probably are not distinguishable from simple losses of B .

Plants of the above constitutions were grown in paired cultures, one made up of sticky plants and one of normal plants. The cultures of a pair were grown from seeds of a single ear; they were separated by endosperm scarring.

At vegetative maturity the plants were examined and all detected sectors recorded for color and approximate size. The method of examination was simple; leaves and husks were removed one at a time and immediately examined for elimination sectors. The culm and tassel were likewise examined.

Results

Of 67 normal plants (A/a ; B/b ; Pl/pl ; St/St or St/st) examined, one showed a single red sector about 4 mm. in width in the culm and leaf sheaths. Of 67 sticky chromosome plants (A/a ; B/b ; Pl/pl ; st/st), 54 showed elimination sectors of one kind or another. The distribution of these with respect to size and color is given in table 1.

The data indicate that elimination of the B gene is about three times as frequent as elimination of the Pl gene and elimination of Pl about three times as frequent as that of the A gene. These relative frequencies indicated by the data may not represent accurately the actual frequencies because elimination of the B gene gives a green sector which is more easily detected than a red or brown sector, particularly if the sector is small. However, it seems probable from the data that the order of frequencies of elimination is correct, that for B being highest, that for A lowest. The relative distances of these three genes from the spindle attachments of the chromosomes in which they are located are not accurately known, but there appears to be no simple relation between these distances and the observed frequencies of elimination.

Table 1. Frequency of elimination sectors in normal and sticky chromosome plants. Numbers of leaves, culms, husks and tassels examined are given in parentheses

Constitu- tion of plants	Color of sector	Approxi- mate width of sector mm.	Leaves (n=631)	Culms (n=633)	Husks (n=900)	Tassels (n=67)	Total
<i>St/St</i> or <i>St/st</i>	Green	2 to 4	0	0	0	0	0
	Red		1	0	0	0	1
	Brown		0	0	0	0	0
Total							1
			(n=576)	(n=576)	(n=1102)	(n=67)	
<i>st/st</i>	Green	0 to 2	24	9	33	0	66
		2 to 4	4	0	17	0	21
		4 +	0	0	4	0	4
	Red	0 to 2	9	9	5	0	23
		2 to 4	0	2	2	0	4
		4 +	0	0	0	0	0
	Brown	0 to 2	4	2	2	0	8
		2 to 4	1	0	0	0	1
		4 +	0	0	0	1	1
Total							128

In addition to the elimination sectors recorded in table 1, there were four cases of variegated ears. In three of these the husks showed many longitudinal stripes of green tissue. In the fourth, the husks were similarly variegated but with brown stripes. McClintock (1932) has shown that maize plants variegated with respect to plant color often carry ring chromosomes. There is cytological evidence that such ring chromosomes are sometimes produced somatically in sticky chromosome plants (Beadle, 1932). It seems reasonable, then, to assume that the four observed cases of variegation resulted indirectly through the formation of ring chromosomes, though there is, of course, no positive evidence that this is the correct interpretation.

Discussion

It has been assumed in the above presentation of data, that the observed sectors are the result of elimination of chromosomes or chromosome fragments. It is of course possible that they may result from gene mutation, particularly since it is known that the frequency of gene mutation (or apparent gene mutation) is relatively high in sticky chromosome plants. Elimination seems to be the more reasonable of the two interpretations since there is direct cytological evidence of somatic elimination of chromosome fragments and since the mutation rate required to give the observed frequency of mosaic plants would have to be very high.

Assuming that the observed sectors do result from elimination, it can be said that the frequency of such elimination must be very high. The observed frequencies for the three genes *a*, *B*, and *Pl* represent minimum values since sectors cannot be detected in all parts of the plant. Elimination of only one of the two allelomorphs of a pair of genes can be detected. Hence observed frequencies for the genes studied are not more than half the actual frequencies. Taking into account that genes in only three of the ten pairs of chromosomes were studied, and that an elimination of a fragment of a particular chromosome may or may not result in the loss of a given gene in that chromosome, it is seen that the absolute frequency of elimination must be so high that every sticky chromosome plant is really a mosaic of tissues of various genetic constitutions. This conclusion is in good agreement with the observation that sticky chromosome plants are conspicuously marked with longitudinal striations (Beadle, 1932).

ENDOSPERM MOSAICS

Methods

Progeny of self pollinated plants of the constitution *C/c*; *St/st* (*C* gene, in the appropriate genotype, gives colored aleurone) were separated with respect to aleurone color and reciprocal crosses made between colored and colorless. Since the endosperm is triploid, these crosses give the following aleurone constitutions:

<i>CC</i> × <i>cc</i>	<i>CCc</i>
<i>cc</i> × <i>CC</i>	<i>Ccc</i>
<i>Cc</i> × <i>cc</i>	<i>CCc</i> or <i>ccc</i>
<i>cc</i> × <i>Cc</i>	<i>Ccc</i> or <i>ccc</i>

From such crosses ears segregating for *st* were selected. Colored kernels of the two phenotypes, *St* and *st*, were examined for colorless patches of aleurone tissue. They were soaked in hot water, the pericarps removed, and the aleurone then examined under a low power binocular microscope. Kernels homozygous for the *st* gene are often strongly scarred and occasionally the aleurone layer is badly developed or absent. Colorless areas resulting from such non-development of aleurone can usually be distinguished readily from elimination patches.

In all doubtful cases, free-hand sections were made and examined for the presence of aleurone cells. A second check on the possibility of irregular development of aleurone tissue is provided in the *st*; *CCc* kernels. The data presented below show that colorless areas are relatively infrequent on such kernels. Because of irre-

gular endosperm development in *st* kernels, many small colorless areas were not recorded. In such cases the possibility of non-development of aleurone cells is difficult to eliminate. The size of the smallest recorded patches varied somewhat with position on the kernel and degree of scarring.

Results

Counts of the frequency of colorless areas, presumably elimination areas, on kernels of various constitutions are give in table 2. It is clear that mosaic kernels occur with a high frequency in

Table 2. Frequencies of chromosome elimination involving the *C* gene for aleurone color, in normal and sticky chromosome kernels

Constitution	Number of kernels	Number of elimination spots					Kernels with elimination spots %
		Many	3	2	1	0	
<i>St</i> ; <i>C/c/c</i>	410	0	0	0	10	400	2.4
<i>st</i> ; <i>C/c/c</i>	377	3	12	32	126	204	46.0
<i>st</i> ; <i>C/C/c</i>	269	0	0	0	8	261	3.0

kernels of the constitution *st*; *C c c*. The non-sticky control kernels of the same constitution with respect to *C*, show a frequency of elimination of about 2.4 per 100. Kernels of the constitution *st*; *C C c* show a frequency of colorless patches of about the same magnitude. In this case the colorless areas presumably result from successive eliminations of *C* in one line of cell progeny.

The frequency of elimination of chromosome fragments must be very high in *st* kernels since, in the case of *C c c* kernels, only the loss of a chromosome fragment carrying *C* can be detected, i. e., for the *C* gene, two thirds of the eliminations are not detected. Since there are ten different chromosomes and since an elimination of a fragment of a particular chromosome may not include a given gene in that chromosome, it is clear that detected eliminations represent less than one thirtieth of those that actually occur.

The irregular development of endosperm tissue in *st* kernels is probably a result of elimination of fragments of chromosomes, which when absent in certain combinations, result in cells with a lower rate of division than normal. This interpretation is supported by the fact that very often there is a clear relation between scarring and colorless areas resulting from an elimination of the *C* locus. The scarring is of such a nature that the endosperm is marked with creases which divide its surface into small patches of more or less normal tissue. Very often the margin of a colorless area coincides for some distance with the crease bordering such an area of normal tissue.

FREQUENCIES OF CHROMOSOME ABERRATION OF MUTATION

Methods

An experiment designed to measure the frequency of mutation and of chromosome translocations in sticky chromosome plants was carried out in the following way: Cultures known to be free of mutations and gross chromosomal abnormalities and segregating for the *st* character were grown. Both normal (*St/St* and *St/st*) and *st* plants were pollinated with a stock homozygous for brown midrib-1 (*bm₁*) and known to be free of seedling and endosperm mutants and of chromosome aberrations. From such crosses, two series of *F₁* cultures were grown, one *St/St* or *St/st* × *bm₁* (control), the other *st* × *bm₁*. The *F₁* plants were examined at various stages of development for dominant mutations. A pollen sample from each plant was examined. Pollen abortion is known to be one criterion of the presence of chromosomal rearrangements (Anderson, 1935).

All plants were then self pollinated. Those showing pollen abortion were self pollinated and also crossed to standard normal plants. At maturity, records were taken on "seed" sets to be used in connection with pollen records for the detection of chromosome rearrangements. For each plant on which self pollinated seed was obtained an examination was made for endosperm mutations, and an *F₂* progeny was grown in the greenhouse for the detection of seedling mutations.

From all *F₁* plants which showed either pollen or ovule abortion or which showed endosperm or seedling mutations in *F₂*, field cultures of *F₂* plants were grown. Cytological examinations were made on plants of those cultures suspected of carrying chromosome aberrations. These which had shown endosperm or seedling mutations were self pollinated in order to check the presence of mutant types in the *F₃* generation. All *F₂* cultures were noted for the segregation of *bm₁* which had been put in through the male parent to serve as a check against contamination by pollen which might have carried mutants or chromosome aberrations.

Chromosome aberration

Of the control *F₁* plants resulting from crosses of *St/St* or *St/st* plants with *bm₁* plants, 1188 were examined for pollen abortion. Of these, 5 showed an appreciable percentage of visibly abnormal pollen grains. Ears were obtained on 1161 of the plants on which pollen examinations were made. Of the 5 plants which showed pollen

abortion, 1 had no ear, 1 showed a normal set of seeds, and 3 showed ovule abortion. In addition to these 5 plants, there was one with apparently normal pollen which produced an incompletely filled ear with kernels of variable size. Hence, among the 1188 plants, 6 showed abnormalities in the pollen or in the seed set. These were tested by selfing or outcrossing, and examination in the next generation. In all cases bm_1 segregated in the cultures from self-pollination, showing that no chromosome aberrations had been introduced by stray pollen contamination. The results obtained are given in table 3. From these results it can be seen that 3 of the plants (1, 2, and 4 in table 3) showed no evidence of heritable chromosome abnormalities. One of the remaining plants (5 of table 3), as judged by a cytological examination of its progeny, evidently carried extra chromosomes and was probably a triploid. Another of the remaining plants (3 of table 3) bred in such a way that one might suppose it to have carried an inverted segment in one chromosome.

Table 3. Tests of control F_1 plants showing pollen or ovule abortion

Plant number	F ₁ generation		Progeny by selfing			Progeny by outcrossing		
	Per cent abnormal pollen	Per cent seed set	Total	Showing abnormal pollen	Showing abnormal seed set	Total	Showing abnormal pollen	Showing abnormal seed set
1	50±(?)					14	0	0
2	50±	50±	16	0	0	8	0	0
3	30±	100—	10	3	0			
4	50±	50±	22	0	0	8	0	0
5	0+	Low ¹⁾	7 ¹⁾					
6	50±	50±	15	5	0	8	1	0

1) Ear had the appearance of those produced on 3n plants; two plants among the progeny had 9 bivalents plus 1 trivalent.

The remaining plant gave in its progeny 5 out of 15 plants showing approximately 50 per cent pollen abortion. It is supposed that this plant carried either a translocation or an inversion. Unfortunately cytological material was not obtained from critical plants in the cultures of the progeny of the last two plants mentioned.

From the results discussed above, it is seen that among 1188 control plants only two showed evidence of carrying heritable chromosome rearrangements. This frequency of occurrence of chromosome rearrangements in normal plants, 1 in 594, can only be taken as an indication of order of magnitude. A possible explanation for those cases in which the F_1 plants showed pollen or ovule abortion but which gave only normal progeny, is that they represent instances of chromatin loss or rearrangement during somatic development but of a nature such that they were not transmitted through the gametophyte generation.

Of the F_1 plants from the cross $st \times bm_1$, 829 were examined for pollen or ovule abortion. Of these, 20 plants showed abnormalities of one kind or another and were tested in a second generation. In all of these cases, bm_1 segregated in cultures from selfing, showing that there had been no contamination by stray pollen. The results of these tests are summarized in table 4. It can be seen from

Table 4. Tests of plants of the cross st by bm_1 showing pollen or ovule abortion in the F_1 generation

Plant number	F_1 generation		Progeny by selfing		Progeny by outcrossing		Cytological examination
	Per cent abnormal pollen	Per cent seed set	Total	Showing pollen and ovule abortion	Total	Showing pollen and ovule abortion	
1	50±	50±	16	6	11	5	ring 4
2	50±	50±	19	17	12	6	ring 4
3	10—	75±	15	5			10 bivalents
4	50±	50±	17	7	11	2	ring 4
5	50±	50±	18	4	10	7	ring 4
6	50±	50±	16	10	9	6	ring 4
7	50±	50±	15	9	10	3	ring 4
8	0+	50±	22	0			none
9	50±	50±	19	6	9	4	ring 4
10	50±	50±	24	11	9	4	ring 4
11	30±	50±	9	4 ¹⁾			none
12	40±	50±	17	0			10 bivalents
13	50±	50±	22	15			ring 4
14	0+	50±	10	4 ²⁾			none
15	50±	50±	18	7	12	8	ring 4
16	50±	50±	24	16	10	6	ring 4
17	50±	50±	24	9	9	4	ring 4
18	0+	50±	19	4 ²⁾			10 bivalents
19	0+	50±	18	2 ³⁾			none
20	50±	50±	20	11	11	7	ring 4 ⁴⁾

1) No ovule abortion.

2) No pollen abortion, ovule abortion not certain.

3) One plant with ovule and pollen abortion; one with pollen abortion only.

4) Ring of 4 seen in low percentage of cells and not too clearly

this summary that two of the 20 plants (8 and 12) bred as normal plants. Four others (11, 14, 18 and 19) gave inconclusive results, while 13 bred in a manner typical for plants heterozygous for reciprocal translocations (see Anderson, 1935, for summary and references to the literature). One plant (3) may possibly have been an inversion heterozygote but this is not certain. Of the 13 plants which bred as translocation heterozygotes, 12 were shown by cytological examination of their progeny to have transmitted ring configurations characteristic of reciprocal translocations.

Omitting all inconclusive cases, the frequency of chromosome aberrations in the progeny of sticky chromosome plants was 13 in 829 or 1 in 64. This frequency is of the order of ten times that for normal plants and, although the frequencies cannot be regarded

as accurately measured, because of their low magnitudes, there can be no doubt that the incidence of chromosome rearrangements in sticky chromosome plants is much higher than in normal plants.

Mutation

From the control F_1 plants (St/St or St/st by bm_1), 1136 F_2 progenies of seedlings were grown. Four of these F_2 cultures showed segregation for seedling characters. Cultures of these were grown to maturity in the field and self-pollinated for confirmation of the F_2 results in the F_3 generation. In the four cases, bm_1 segregated in the field-grown plants, showing that the segregating genes had arisen by mutation and had not been introduced through the functioning of foreign pollen at the time the original crosses were made.

One of the segregating characters proved, by appropriate tests, to be a maternally inherited stripe somewhat similar to those previously described in *Zea* by Anderson (1923) and by Demerec (1927). Evidently this case represents a new occurrence of a maternally inherited character, presumably transmitted by the cytoplasm of the egg.

A summary of the behavior of the remaining 3 characters in F_2 and F_3 generations is given in table 5. These three characters are all recessive and lethal in the embryo or seedling stage.

Table 5. Tests of control F_1 plants showing endosperm or seedling mutations

Plant number	Character	Segregation in F_2		Segregation in F_3	
		X ¹⁾	x	X	x
1	Yellow seedling (lethal)	54	8	59	16
2	White seedling (lethal)	56	1	32	3 ²⁾
3	Defective endosperm (lethal)	not counted		157	39

1) Normal individuals represented by X, mutant by x.

2) White seedlings very weak.

The frequency of gene (?) mutation in the control plants is therefore 3 in 1136 or 1 in 379.

Among 793 F_2 progenies of F_1 plants of the cross $st \times bm_1$, 16 were found to be segregating for endosperm or seedling characters. Five additional "doubtful" cases of segregation were recorded but excluded after the completion of F_3 tests. Cultures of F_2 plants were grown in the field in all cases where F_2 seed or seedling cultures showed signs of segregation. In all these cases, bm_1 was observed to segregate, thus excluding contamination as a cause of F_2 segregation. The results of F_2 and F_3 tests are recorded in table 6. All characters are apparently monogenic recessives, most of them lethal in the embryo or seedling stage.

In one instance (number 7, table 6) 2 F_1 plants in a culture of 3 showed segregation for characters presumably the same (brittle endosperm). This mutation presumably arose somatically in the sticky chromosome parent. In no other case did more than one F_1 plant of a culture segregate for a given character. It can therefore be concluded that the mutations occurred during or at a stage not far removed from the meiotic divisions.

Table 6. Tests of plants of the cross *st* x *bm*₁ showing endosperm or seedling mutations in the F_2 generation

Plant number	Character	Segregation in F_2		Segregation in F_3	
		X	x	X	x
1	Defective endosperm (lethal)	not counted		296	63
2	Defective endosperm (lethal)	not counted		264	82
3	Defective endosperm (lethal)	not counted		582	201
4	Defective endosperm (lethal)	not counted		about 3:1	
5	White seedling (lethal)	33	14	100	32
6	White seedling (lethal)	31	15	104	31
7 ¹⁾	Brittle endosperm (viable)	not counted		about 3:1	
8	White seedling (lethal)	30	3	103	24
9	White seedling (lethal)	26	7	113	66
10	Yellow seedling (lethal?)	31	7	material lost	
11	Defective endosperm (lethal)	not counted		209	57
12	Glossy seedling (semi-lethal?)	26	6	98	23
13	White seedling and brittle endosperm (lethal)	not counted		about 3:1	
14	White seedling—weak plant (lethal)	38	7	84	14
15	Defective endosperm (lethal)	not counted		209	74
16	Small seeds (viable?)	not counted		50	13

1) Two F_1 plants of a culture of three segregated for this character, presumably the result of one mutation in a somatic cell of the *st* parent.

The character recorded in table 6 under number 13 is interesting. This character was found segregating on the F_1 ear as a "brittle endosperm". On making seedling tests, it was found that all brittle seeds gave white seedlings. The numbers of individuals grown were limited so that it cannot be said definitely whether this case represents mutation of two closely linked genes or mutation at a single locus concerned with both endosperm and chlorophyll development.

In addition to the recessive mutants recorded in table 6, a dominant mature plant character was found. Plants showing this character have the spikelets of the staminate inflorescence arranged in whorls. A small F_2 culture contained 17 normal and 3 whorled plants. The mode of segregation is not clear from so few plants, but whorled does not appear to be a simple dominant character transmitted in an orthodox manner. One might suspect that "whorled" is associated with some kind of chromosome abnormality.

Excluding the inconclusive case of whorled and assuming number 7 of table 6 to represent 1 mutation, there were 16 mutations among

the 793 tested plants. This frequency, 1 in 49, is clearly much higher than that observed for the normal control plants (1 in 379). It is evident, then, that the incidence of mutation in sticky chromosome plants is much higher than that characteristic of normal plants.

RELATION OF CHROMOSOME ABERRATIONS AND MUTATIONS

It is interesting to know whether chromosome aberrations and "gene" mutations are in any way associated in their occurrence in sticky chromosome plants. In the present study there was only one case of coincidence of chromosome aberration and "gene" mutation. The reciprocal translocation recorded in table 4 under number 16 was found in a plant which was found to be segregating for a brittle endosperm-white seedling character (number 13, table 6). As mentioned above, the brittle endosperm and white seedling mutations may represent mutation of two closely linked genes or of a single gene concerned with two characters. In the field-grown F_2 culture and also in the culture from outcrossed seed, all plants were selfed. The brittle endosperm character was observed to segregate in the progeny of both "normal" and partially sterile plants. It can be concluded therefore that the translocation and mutation are not inseparably associated.

It can be concluded that, so far as the evidence presented above goes, there is no correlation between the occurrence of chromosome aberrations and "gene" mutations.

MUTANT OF UNKNOWN NATURE

Among the F_1 plants of the cross $st \times bm_1$ there was a group of plants the nature of which is not clear. In a total of 849 plants, there were 17 plants, distributed in 10 of 94 cultures, which were smaller than normal and which showed longitudinal stripes of green and white tissue. These ranged in size from very small plants which did not flower to plants somewhat smaller than their normal sibs. The larger plants produced pollen and ears. No such character appeared in any of the parents of the original crosses, to make doubly sure of this, a duplicate culture of the bm_1 stock which served as the staminate parent of all crosses was grown. In this culture, the seed of which was obtained by self pollination, there were 30 plants, all normal. Hence it is clear that these striped plants did not represent segregation of a recessive character for which the parents were heterozygous.

Of the 17 striped plants, 13 produced pollen. In no instance, did the pollen show visible abnormalities. Ears were obtained on

13 plants and in all cases the seed-sets were such as would be expected from normal plants. A cytological examination was made of the meiotic divisions in one striped plant; no abnormalities were apparent.

Progenies, by self pollination, were grown from 3 striped plants. In all cases the plants so obtained were normal in appearance, showing no signs of striping. In addition, one culture was grown from seed obtained by crossing a striped plant with a normal female parent. Here, too, all plants were normal.

Among 1189 control plants there were two striped plants in 1 of the 14 cultures grown. These two plants had much the same appearance as those discussed above.

It is clear from the evidence presented above that these striped plants do not represent a character transmitted in an ordinary mendelian manner. The evidence indicates that these plants were normal in their chromosome constitution. The only explanation that the author can offer for their occurrence is that they were the result of some plastid abnormality contributed by the cytoplasm of the sticky chromosome parent. Assuming that this is the correct explanation, it is evident that the cytoplasmic abnormality was temporary and was not transmitted to the next generation. This case is perhaps one of the same nature as the "Dauermodifikationen" of Jollos.

DISCUSSION

It is evident that the physiology of cell division in sticky chromosome plants is abnormal. Apparently all cells of the plant are affected. The results of this disturbance, which must be regarded as a general effect on the cell, are strikingly similar to the results which follow X-ray treatment in plants. Thus:

1. Sticky chromosome plants resemble in their macroscopic appearance plants which have received a rather heavy dosage of X-rays in the seedling stage.
2. The chromosome behavior during mitosis and meiosis is strikingly similar to that observed in cells following X-ray treatment (See Goodspeed, 1935, for discussion and references to literature).
3. Somatic elimination of chromosomes and of chromosome fragments is frequent in sticky chromosome plants and also in plants following X-ray treatment (Stadler, 1931).
4. Chromosome rearrangements occur with a high frequency in sticky chromosome plants; this is a characteristic X-ray effect.
5. Mutations are relatively frequent in sticky chromosome plants.

While the above-mentioned similarities between the effects of the sticky chromosome gene and the effect of X-ray treatments do not justify a definite conclusion, they do strengthen the argument that X-rays produce their characteristic effects indirectly through a general change in the physiology of the cell, i. e., not by "direct gene hit" (see Schultz, 1935, for discussion of this question and for references to the literature).

One of the problems which concerns geneticists is that of whether induced gene mutations represent a change different in principle from chromosome rearrangements or whether, on the other hand, the two phenomena are really two aspects of a single primary effect. The sticky chromosome case adds little to the argument aside from adding another example to the known cases in which an increase in mutation frequency is accompanied by an increase in the frequency of chromosome rearrangements. The evidence presented above indicates that in the sticky chromosome case the increases in the two types of changes are of about the same order of magnitude. The question of the relation between the mutations produced in sticky chromosome plants and chromosome abnormalities (deficiencies, etc.) might perhaps be answered by a careful cytological study of the mutations obtained, but such a study involves several obvious difficulties and has not been attempted.

SUMMARY

Elimination of chromosomes or chromosome fragments during somatic cell division in sticky chromosome plants is shown by genetic tests to occur for those segments of chromosomes carrying the plant color genes *a*, *B*, and *Pl*. The relative frequencies with which fragment or whole chromosomes carrying these genes are eliminated are probably in the order $B > Pl > a$.

Elimination of the chromosome carrying the aleurone color gene *C* (number 9), or fragments including this gene, is shown to be relatively frequent in endosperm tissue homozygous for the *st* gene. Chromosome unbalance resulting from elimination is apparently related to the "scarring" characteristic of endosperm tissue homozygous for the *st* gene.

The frequency of chromosome rearrangements (for the most part, reciprocal translocations) was 1 in 64 in the progeny of *st* plants as compared with a frequency of 1 in 594 for comparable normal controls.

The frequency of mutations in the progeny of sticky chromosome plants was 1 in 49 as compared with 1 in 379 for the normal controls.

In no case was a detected mutation inseparably associated with a detected chromosome rearrangement.

In the F_1 of the cross $st \times bm_1$ there appeared a group of plants showing longitudinal white stripes. This striping was not carried by the parents and was not transmitted to progeny resulting from self-pollination. Presumably some cytoplasmic abnormality was produced in the st parent, transmitted to the F_1 plants, but not carried to the next generation.

Literature Cited

- Anderson, E. G. Maternal inheritance of chlorophyll in maize. Bot. Gaz. 76: 411-418.
1923
1935 Chromosomal interchanges in maize. Genetics 20: 70-83.
- Beadle, G. W. A gene for sticky chromosomes in *Zea mays*. Ztschr. ind. Abst.
1932 u. Vererb. 63: 195-217.
- Demerec, M. A second case of maternal inheritance of chlorophyll in maize. Bot.
1927 Gaz. 85: 139-155.
- Emerson, R. A. The genetic relations of plant colors in maize. Cornell Univ. Agr.
1921 Exp. Sta. Memoir 39: 1-156.
- Emerson, R. A., Beadle, G. W. and Fraser, A. C. A summary of linkage studies in
1935 maize. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir 180: 1-83.
- Goodspeed, T. H. Induced chromosomal alterations. In Biological effects of radiation Vol. II: 1281-1295. McGraw-Hill, New York.
1936
- McClintock, B. A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea*
1932 *mays*. Nat. Acad. Sci. Proc. 18: 677-681.
- Schultz, J. Radiation and the study of mutation in animals. In Biological effects of
1936 radiation Vol. II: 1209-1211. McGraw-Hill, New York.
- Stadler, L. J. The experimental modification of heredity in crop plants I. Induced
1931 chromosomal irregularities. Sci. Agr. 11: 557-572.
-

**Cyto-genetical Studies in the Genus *Solanum*. I.
Autopolyploidy of *Solanum nigrum* Linn.***

By
Miyawo Nakamura

In the previous paper (11), the present author reported that there occurs two different karyological forms of *S. nigrum* in Taiwan (Formosa). One of these is the ordinary Black Nightshade which is represented by 36 chromosomes in the haploid phase, while the other is a very interesting one being characterized by 12 chromosomes. The latter is the commonest weeds of Taiwan widely distributing throughout the island. A large number of specimens of the latter type deposited in the herbaria in Taihoku are identified as *S. nigrum* L. without exception. The present paper deals with the results of a cytological study of both types with the comparison of morphological characters, and a survey of geographical distribution, bringing about the criticism upon the problem of polyploidy of this group of plants with reference to the origin of the species involved.

The author wishes to express his appreciation to Prof. Tyôzaburô TANAKA for his helpful suggestions and criticisms given relative to the preparation of this paper.

Taxonomic aspects

Both types of wild plants display large variation in the habit of growth and in the size and the shape of vegetative organs, in response to the environmental condition under which they grow. But the seedlings of each type are all true to type, if they are raised under an identical condition such as in a glass house. The failure of the systematists in detecting the morphological difference in both types is probably due to the plasticity of plant. Close examination of both types of the plants, however, brought to light several characters, by which one can be distinguished from the other, and such distinction is easier, when flesh materials are used than herbarium specimens are consulted.

A taxonomic study of both types with an assistance of Mr. K. ODASHIMA brought the conclusion that the type with 36 chromosomes is the typical *S. nigrum*, whereas the other with 12 chromosomes must

* Contributions from the Horticultural Institute, Taihoku Imperial University No. 21.

be a new species which was named *Solanum photeinocarpum* NAKAMURA et ODASHIMA (12).

In order to illustrate the difference of both types, the most contrasting characters are compared in Table 1.

Table 1. Contrasting characters of *S. nigrum* and *S. photeinocarpum*

	<i>S. nigrum</i> (n = 36)	<i>S. photeinocarpum</i> (n = 12)
Height	About 70 cm.	About the same.
Stem	Terete or subangular in cross section, covered with minute pubescence, spines indistinct.	Angular in cross section, rather glabrous, spines distinct.
Leaf	3 × 5–5 × 8 cm. large, dark green, midribs and veins being often tinged with purple color, thick, ovate or broad ovate and becoming obtuse or acute at the apex, covered with scattered hairs. Margin irregularly crenate or unevenly undulate.	3 × 6–9 × 13 cm. large, light green, thin broad lanceolate or elliptic, becoming usually acute or caudate-acuminate at the apex, rather glabrous. Margin irregularly dentate or nearly entire.
Inflorescence	Raceme, 6–9 flowers.	Umbel, 4–7 flowers.
Corolla	White, yellowish green at the base, 8–14 cm. in diam. Lobes 5, triangular.	White, light yellowish green at the base 6–11 cm. in diam., Lobes 5, oblong-ovate or narrow triangular.
Calyx	Cupulate. Lobes 5, subulate.	Cupulate. Lobes 5, oblong lanceolatis, becoming obtuse at the apex.
Stamens	Free, short, bright yellow.	Do.
Style	Same in length as stamens.	Do.
Fruit	Globose or oblate, 7–9 mm. in diam., purplish black, never shining.	Globose or oblate, 6–8 mm. in diam., shiny bluish black.
Seeds	About 40, 2–2.5 mm. in width.	About 70, 1.5–1.8 mm. in width.

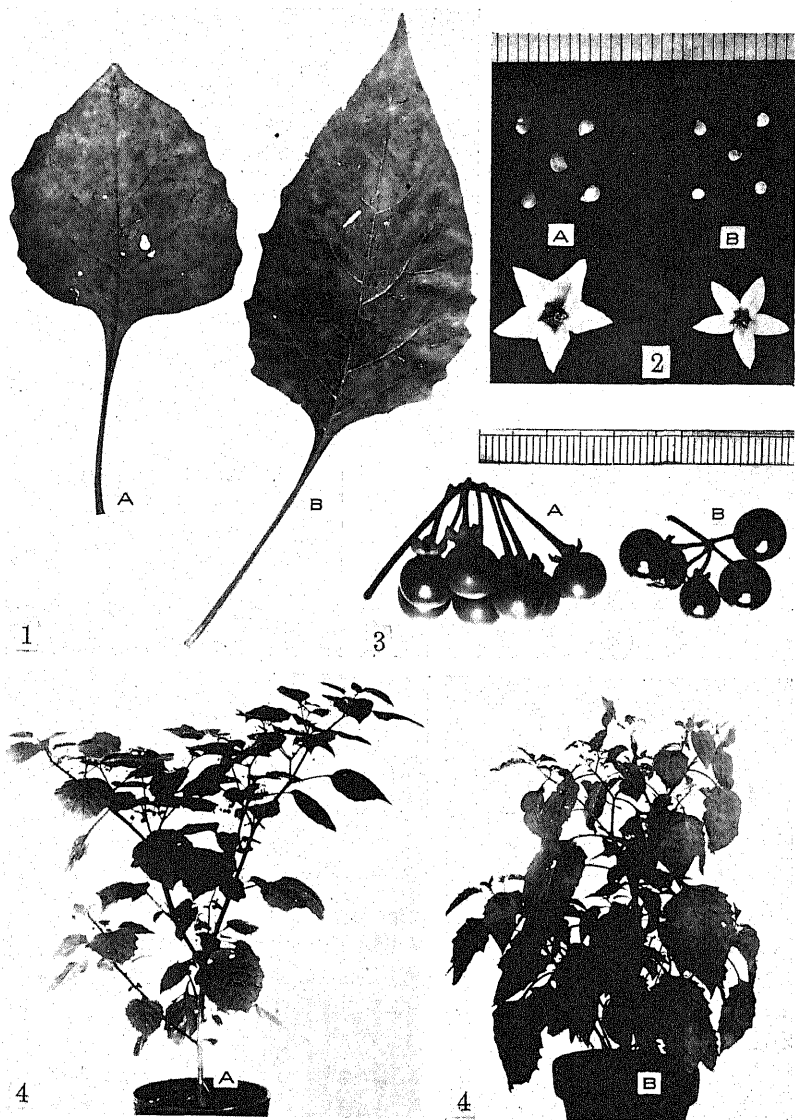
Text-fig. 1 illustrates the leaf, flower, fruits and seeds of both types that were collected flesh from seedlings raised under an identical condition and the whole plants of both types are also shown. The measures given in this figure are graduated in millimetres.

In addition to the typical *S. photeinocarpum*, there is an other form which is generally classed into *S. nigrum*. This form belongs to the class n = 12. It is distinguished, however, by its wider leaves, larger flowers, racemose inflorescence and smaller fruits, often failing to set fruits. This plant is probably a variety of *S. photeinocarpum*.

Geographical distribution

To determine the natural range of occurrence of *S. nigrum* and *S. photeinocarpum*, a collection of seeds from various locales through-

out the empire was made by the assistance of the author's friends.¹⁾ The chromosome number and the morphological characters were studied with the plants which were raised from seeds in Taihoku. The specimens deposited in the Tanaka Herbarium, the Herbarium

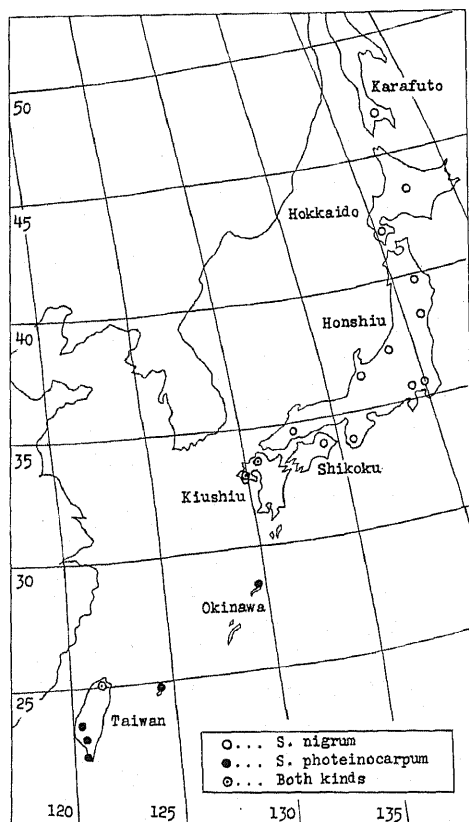


Text-fig. 1. *Solanum nigrum* (A) and *Solanum photeinocarpum* (B). 1, leaves; 2, seeds and flowers; 3, fruits; 4, whole plants.

1) In this connection, the author wishes to express his indebtedness to Mr. Y. NAKAJIMA, Mr. M. ARIMA, Prof. E. FUKUSHIMA, Mr. Y. HAYASHI, Mr. M. SASAWO, Mr. S. SUZUKI, Mr. K. TAMAKI and Mr. Y. TAKIGUCHI.

of the Botanical Institute of the Taihoku Imperial University and the Herbarium of the Taihoku Botanic Garden were also examined

to make the survey more complete. The result is mapped in Text-fig. 2.



Text-fig. 2. Natural range of *S. nigrum* and *S. photeinocarpum* in Japan.

As the figure illustrates, the typical *S. nigrum* distributes in the northern part of Japan, from Karafuto to Kiushiu, while *S. photeinocarpum* is found in the south, from Kiushiu to Taiwan. One case of the occurrence of *S. nigrum* in Taiwan must be an exceptional case interpreted as follows: In this island, the occurrence of a large number of this plant is limited to the enclosure of the Shirin Horticultural Experiment Station ground. It was found to grow also in the nurcerries of our institute and RYÔ's garden at Seira-Gai of Tainan Province where a few individuals were found. The first discovery of this plant was done by the author and ODASHIMA last year. These

facts must indicate that the plant is an introduced origin recently reached to the island. As the Shirin Horticultural Experiment Station is the place where nursery plants of fruit-trees are always coming in from the Main Island and abroad, the seeds of *S. nigrum* must have been unconsciously introduced to this station and then scattered over with their plants to the other places.

The unexpected occurrence of *S. nigrum* in Taiwan is taken for granted as an exceptional case, the natural range of *S. nigrum* and *S. photeinocarpum* in Japan is geographically distinct inhabiting in the different climatic belts, i.e. the former, with high chromosome number, is distributed throughout the temperate region, while the latter with low chromosome number is found in the subtropical and tropical regions. From the examination of our herbarium materials,

similar relationship is found to be prevalent with other part of the world, since the specimens from Central Europe, Sweden, and North America represent the form of *S. nigrum*, while the specimens from the warm districts, such as India, the Philippines and Canary islands are linked closely, if not identical, with *S. photeinocarpum*. In Fukien province, China, *S. nigrum* and the other form which is assumed to be a variety of *S. photeinocarpum*, have been collected.

The plant materials raised from the seeds collected by Mr. TAMAKI in Shimonoseki have turned out to be *Solanum aggregatum* JACQ., first time recorded from Japan, probably introduced from abroad.

Cytological observation

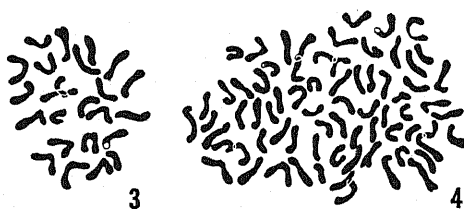
A. Method

Root tips collected from the plants grown in pots were fixed in NAVASHIN's solution. The observation on meiosis was made from slides prepared by BELLING's smear method. The smeared materials used in the most of the cases were fresh young anthers, but in certain cases, the anthers which had been stored in 80% alcohol after they were fixed in CARNOY's solution has been used. The slides were heated for a short time after mounting. This treatment gave satisfactory result, the chromosomes being stained deeply and the cytoplasm being destained fairly well.

B. *S. photeinocarpum*

The counting of the chromosomes in the cells of root tips shows that this plant is represented by the lowest chromosome number of the genus *Solanum*, i.e. 24 (Text-fig. 3). The meiosis of the pollen mother cells are quite regular.

At diakinesis, 12 bivalent chromosomes are observed, which are characterized by one or two terminal chiasmata (Text-fig. 5). The chromosomes are arranged uniformly on the equatorial plate at the first metaphase (Text-fig. 7, Pl. 3, Fig. 1). They take

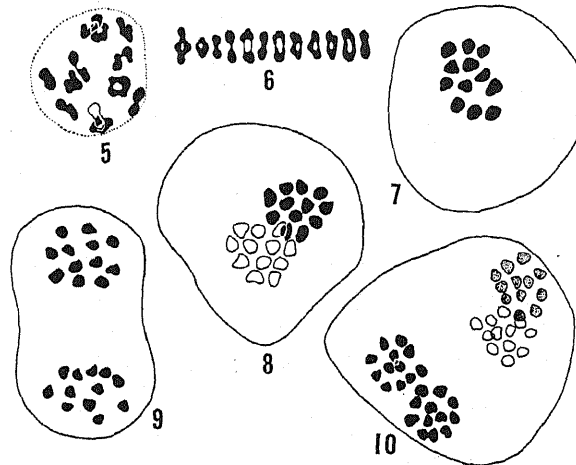


Text-figs. 3-4. Somatic chromosomes (\times ca. 2,200). 3, *S. photeinocarpum*; 4, *S. nigrum*.

generally rod- or ring-shape following the mode of chiasma (Text-fig. 6). The division in anaphase takes place in usual way (Text-fig. 8, Pl. 3, Fig. 2). At the second metaphase, 12 chromosomes are counted again on each equatorial plate (Text-fig. 9, Pl. 3, Fig. 3). The anaphase division is regular with no laggard (Text-fig. 10).

Finally, normal tetrads and complete pollen grains (Plate 3, Fig. 10) are formed.

The chromosome behavior demonstrated above indicates clearly that the present material is one of the diploid forms of the genus *Solanum*.



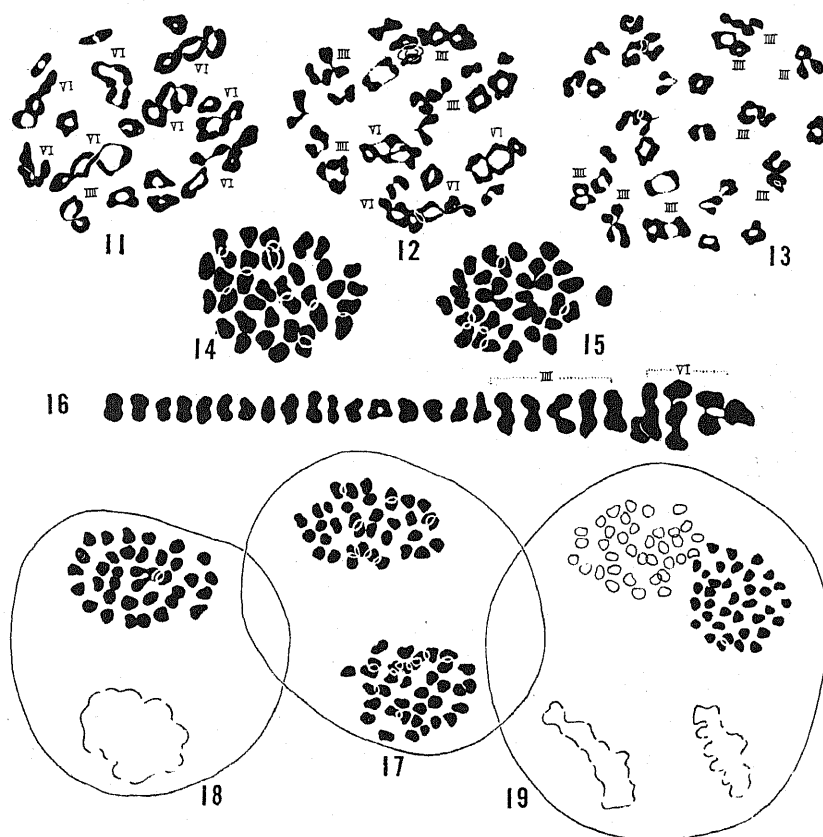
Text-figs. 5-10. Meiosis of the pollen mother cells of *S. photeinocarpum* (\times ca. 1,700). 5, diakinesis; 6, side view of the chromosomes at the first metaphase, each chromosome being drawn apart from each other; 7, polar view of the chromosomes at the first metaphase; 8, the first anaphase; 9, the second metaphase; 10, the second anaphase.

C. *S. nigrum*

The counting of the somatic chromosomes of *S. nigrum* agrees with the results obtained by WINKLER (19) and JØRGENSEN (3). It showed 72 chromosomes in the cells of root tips (Text-fig. 4). Workers (3, 4, 14, 16, 17, 18, 19) who studied the chromosomes of the

Black Nightshade at the first metaphase reported that all appears as bivalents. But the chromosome behavior, especially the mode of conjugation of chromosomes, observed by the present author is different from the result obtained by the other workers. In diakinesis, the author found frequently quadrivalents and hexavalents besides bivalents. The number of hexavalents varied from 0 to 8 corresponding to the number of quadrivalents and bivalents. Examples of diakinesis with the three kinds of chromosomes are illustrated in Text-figs. 11-13, (Plate 3, Figs. 4-6). Among the chromosomes observed in Text-fig. 11 (Plate 3, Fig. 4), we can easily distinguish 8 hexavalents, 1 quadrivalent and 10 bivalents. In drawing this figure, the cytoplasm was slightly squeezed with the cover glass to arrange all the chromosomes on the same plane. In Text-fig. 12 (Plate 3, Fig. 5), there are 4 hexavalents, 4 quadrivalents and 16 bivalents. No hexavalent is found in Text-fig. 13 (Plate 3, Fig. 6), but it comprises 8 quadrivalents and 20 bivalents. The hexavalents and the quadrivalents appeared in diakinesis are found to fall into various types according to the number of conjugate chromosomes and the number and position of chiasmata, whereas the bivalent

chromosomes are characterized by one or two chiasmata, taking usually ring-shape, U-shape or dumb-bell shape.



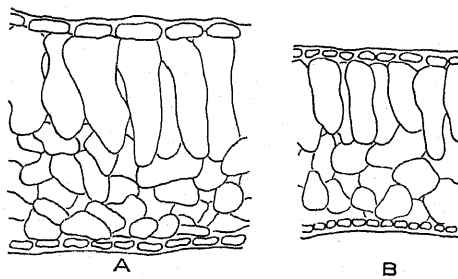
Text-figs. 11-19. Meiosis of the pollen mother cells of *S. nigrum* (\times ca. 1,700). 11-13, diakinesis chromosomes, showing the appearance of bivalents, quadrivalents (IV) and hexavalents (VI); 14, the first metaphase comprising 36 bivalents; 15, the first metaphase, showing that some of the chromosomes closely assemble in three; 16, the first metaphase chromosomes consisting of 17 bivalents, 5 quadrivalents (IV) and 3 hexavalents (VI); 17, the second metaphase having 36 chromosomes on each equatorial plate; 18, the second metaphase, showing the appearance of 2 tripartite and 2 dipartite chromosomes besides single ones; 19, the second anaphase.

At the first metaphase, some figures show 36 bivalents (Text-fig. 14 and Pl. 3, Fig. 7), while, in the other figures, some of the chromosomes assemble so closely that it is difficult to count accurately all the elements (Text-fig. 15, and Pl. 3, Fig. 8). The latter case is probably due to the existence of multivalent chromosomes. Text-fig. 16 illustrates the case that 3 hexavalents, 5 quadrivalents and 17 bivalents were found at a side view of the first metaphase. In anaphase the chromosomes separate regularly towards each pole.

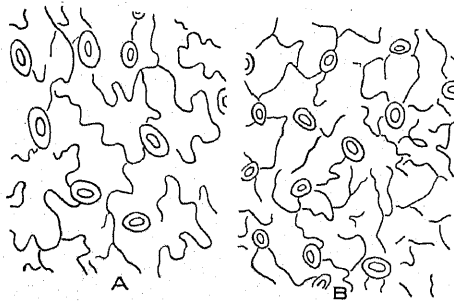
The counting of chromosomes at the second metaphase is done easily as we can identify most of the chromosome units. In some cases, we count here 36 chromosomes on each equatorial plate (Text-fig. 17). However, the appearance of a few tripartite or dipartite chromosomes is not rare (Text-fig. 18, Pl. 3, Fig. 9). Such chromosome is undoubtedly originated from the quadrivalents or hexavalents which were halved in the first meiosis. In the second anaphase, all the chromosomes separate regularly towards the poles (Text-fig. 19). It is followed by the formation of normal pollen tetrads and perfect pollen grains. (Pl. 3, Fig. 11).

Morphological observation

As we know that polyploidy brings about gigas forms in certain plants, it would be interesting to find out how the diversity of chromosome number in the present case gives influence upon the size of various parts of organs. The author measured one hundred each of flowers, fruits and seeds of *S. nigrum* and *S. photeinocarpum*, and obtained the result that those of *S. nigrum* is markedly greater than those of *S. photeinocarpum*. This is illustrated in Table 2 (See also Text-fig. 1).



Text-fig. 20. Cross sections through a portion of leaves. A, *S. nigrum*; B, *S. photeinocarpum*. (x ca. 160).



Text-fig. 21. Stomata of the under side of leaves. A, *S. nigrum*; B, *S. photeinocarpum*. (x ca. 160).

Similar relationship was found also in the anatomical study of leaves. In this case, the epidermis and the palisade cells of *S. nigrum* were strikingly larger than those of *S. photeinocarpum*. (Text-fig. 20). The stomata of leaves were studied indirectly by the SUMP method. It showed that *S. nigrum* is larger in the size of stomata, but fewer in the number of them per unit area, in comparison with *S. photeinocarpum* (Text-fig. 21). The data are summarized in Table 3.

The pollen grains of both plants are practically complete-fertile, the occurrence of the empty ones being less than 4% in both cases.

Table 2. Size of flowers, fruits and seeds

	<i>S. nigrum</i>	<i>S. photeinocarpum</i>
Diameter of corollas	mm. 11.42	mm. 8.47
Fruits height	7.49	6.57
diameter	8.00	7.07
Seeds length	1.79	1.49
width	1.49	1.20

Table 3. Size and distribution of stomata

Species \ Stomata	Size		No. per unit area*
	Length	Dia- meter	
<i>S. nigrum</i>	39 ^μ	29 ^μ	7.9
<i>S. photeino- carpum</i>	23	20	16.0

* The unit area in this case means the area of field of the microscope which was obtained by the combination of Zeiss AP. 40× K 15 at the tube length of 160 mm.

The size of pollen grains, however, differs corresponding to the chromosome numbers of the plants. (Pl. 3, Figs. 10 and 11). The measurement of the diameter of pollen grains showed that *S. nigrum* is about 35 micra, while *S. photeinocarpum* is about 25 micra.

Discussion

In *S. nigrum* the question of chromosome conjugation is very important. Yet, with the exception of the work of JØRGENSEN (3), little effort has been made to gain a comprehensive view of cytology. WINKLER (18, 19), VILMORIN and SIMONET (16, 17), and TOKUNAGA (14) reported that 36 bivalent chromosomes appear at the first meiosis. JØRGENSEN and CRANE (4) counted the same chromosome number in the meiosis of the pollen mother cells in the *nigrum* tissue of certain graft hybrids. In his later study, JØRGENSEN (3) compared the meiosis of haploid, diploid, triploid and tetraploid forms of *nigrum*, and he considers that the presence of trisome or tetrasome is possible in the diploid form, though he could not find any evidence. In *S. nigrum*, the appearance of 36 bivalents is a possible case, but, as proved, in the present study there is the other case that hexavalents and quadrivalents occur besides bivalents. In an extreme case, the present author counted 8 hexavalents at diakinesis, and he found also tripartite or dipartite chromosomes at the second metaphase. It is a known fact that the association of non-homologous chromosomes is brought about in certain plants by the influence of abnormal environmental factors, such as low temperature, or by the occurrence of segmental interchange. But, it is not the case in *S. nigrum*, because, the association of chromosomes does not take place at random, resulting always bivalents, quadrivalents or hexavalents, and the meiosis is carried out quite regularly, followed by the formation of complete pollen grains.

Judging from the occurrence of a large number of hexavalents, the author considers that *S. nigrum* is an autohexaploid which was brought about by the multiplication of 12 basic chromosomes. An

evidence which supports this view is obtained in the experiment of JØRGENSEN (3). According to him, a few trisomes were observed as well as bivalents and univalents in the meiosis of his haploid *nigrum*. Such chromosome behavior is quite strange if the plant is a true haploid, but it is natural if we assume that the plant is autotriploid which was raised parthenogenetically by the development of the haploid egg cell of the autohexaploid parent.

The variation in the pairing of chromosomes in meiosis, also seems to be parallel to that observed in autotetraploid tomatoes. In these plants, some workers (2, 7, 19) observed that most of the chromosomes were bivalents, while the others (5, 6, 13) reported that there occurs a large number of quadrivalents. According to HUMPHREY (2), there are usually 12 tetrasomic groups at middle diplotene, more or less associated though the number of units increases following the advancement of meiotic stages, giving finally a large number of bivalents and a few quadrivalents. At the metaphase of the first division, the chromosomes are contracted so closely as it is difficult to distinguish the individual chromosomes, but there seems to be a tendency to clump in four. UPCOTT (15) assumes that increasing or decreasing in the number of units in these cases are due to either influence of environmental condition or special characters of genotypes.

In *Solanum nigrum*, the multiplication of the chromosome number is associated with the increase of the size of various parts of the organs. This fact was illustrated clearly by WINKLER (19) with his tetraploid *nigrum*. In this particular plant, flowers, pollen grains, palisade cells and stomata are markedly larger in comparison with those of the diploid parent. According to JØRGENSEN (3), petals and leaves of *Solanum nigrum*, show different characters when the chromosome number is doubled or halved. They become narrower and thinner in the haploid, and broader and thicker in the triploid and the tetraploid. Analogous cases are found with respect to *S. photeinocarpum* and *S. nigrum*. In the former, with lower chromosome number, the parts of organs such as flowers, pollen grains, fruits, seeds, palisade cells and stomata are strikingly smaller in comparison with those of the latter, and the petals and leaves are also decidedly narrower and thinner.

In studying the distribution of the diploid and the tetraploid forms of *Vaccinium uliginosum*, HAGERUP (1) states that polyploid forms may be ecologically changed so as to grow in other climates and formations where the diploid form will not thrive. Analogous facts were reported by MANTON (8, 9) with *Biscutella laevigata* and *Nasturtium officinale* and by MATSUURA (10) with *Fritillaria cam-*

schatensis. The natural occurrence of *S. photeinocarpum* and *S. nigrum* with reference to the chromosome numbers resembles the case of *Nasturtium officinale* in which the diploid form is distributed throughout the south of Europe, whereas the tetraploid form is found in the north.

All facts enumerated above seem to show that there is an intimate relationship between *S. photeinocarpum* and *S. nigrum* in connection with the evolution of species. Close resemblance in general appearance of both forms and the difficulty of identification, easily overlooked by the systematists, suggest also the possibility of this supposition, although it is hard to say that the latter was derived directly from the former. To make this point clear, it is necessary to study the affinity of chromosomes in F_1 progenies from a cross between both plants. The study on this line is now in progress, as the author succeeded to obtain several seeds by cross-pollinations, which will be brought to the experiment of the coming season.

Summary

1. Among the plants generally termed as *S. nigrum* by the systematists the author found two types, karyologically distinct. One of them is $n = 12$, and the other $n = 36$.

2. Close examination proved that both types are not exactly alike, differing in many points of their morphological characters. The type with 36 chromosomes is the typical *S. nigrum*, but, the other with 12 chromosomes deserves to receive a new specific name, *S. photeinocarpum*.

3. *S. nigrum* is generally distributed throughout the northern part of Japan, whereas *S. photeinocarpum* occurs in the south. *S. nigrum* rarely found in Taiwan is of recent introduction, and its distribution is limited only to a few locales.

4. The chromosome behavior observed in meiosis proved that *S. photeinocarpum* is a diploid form of the genus *Solanum*, while, *S. nigrum* is an autohexaploid.

5. Size of the vegetative and reproductive organs of *S. nigrum* is markedly larger than that of *S. photeinocarpum*.

6. The comparison of morphological characters and the survey of geographical distribution suggest that, there is an intimate relationship between both types with respect to the evolution of species.

Literature

1. Hagerup, O. (1933). Studies on polyploid ecotypes in *Vaccinium Uliginosum* L. *Hereditas* 18: 122-128.
2. Humphrey, L. M. (1934). The meiotic division of haploid, diploid and tetraploid tomatoes with special reference to the prophase. *Cytologia* 5: 278-300.

3. Jørgensen, C. A. (1928). The experimental formation of heteroploid plants in the genus *Solanum*. Journ. Genet. 19: 133-211.
4. — and M. B. Crane (1927). Formation and morphology of *Solanum* chimeras. Journ. Genet. 18: 245-273.
5. Lesley, M. M. and Lesley, J. W. (1930). The mode of origin and chromosome behaviour in pollen mother cells of a tetraploid seedling tomato. Journ. Genet. 22: 419-425.
6. Lindstrom, E. W. and K. Koos (1931). Cyto-genetic investigations of a haploid tomato and its diploid and tetraploid progeny. Amer. Journ. Bot. 18: 398-410.
7. — and L. M. Humphrey (1933). Comparative tetraploid tomatoes from different source. Genetics 18: 193-209.
8. Manton, I. (1934). The problem of *Biscutella laevigata* L. Zts. induk. Abst.-u. Vererbungsl. 67: 41-57.
9. — (1935). The cytological history of watercress (*Nasturtium officinale* R. BR.). ibid 69: 132-157.
10. Matsuura, H. (1935). On karyo-ecotypes of *Fritillaria Camtschatscensis* (L.) KERGAWLER. Journ. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. 5, 3: 219-232.
11. Nakamura, M. (1935). Preliminary note on the polyploidy in *Solanum nigrum* LINN. Jour. Soci. Trop. Agr. 7: 255-257.
12. Odashima, K. (1936). Plantarum Formosanarum species novae determinatae II. ibid 8: 54-62.
13. Oka, T. H. (1936). The progeny of tetraploid tomatoes (Preliminary report). Jap. Journ. Genet. 12: 89-92.
14. Tokunaga, K. (1934). Studies on the chromosome numbers of some species in Solanaceae. ibid 9: 231-238.
15. Upcott, M. (1936). The cytology of triploid and tetraploid *Lycopersicon esculentum*. Journ. Genet. 31: 1-19.
16. Vilmorin, R. de et M. Simonet (1927). Variations du nombre des chromosomes chez quelques Solanées. C. R. Acad. Sci. Pairs 184: 164-166.
17. — et — (1928). Recherches sur le nombre des chromosomes chez les Solanées. Verh. des V. Internat. Kongr. f. Vererbungswiss., Berlin, 1927, II; Zts. f. ind. Abst.-u. Vererbungsl. Suppl. 2: 1521-1536.
18. Winkler, H. (1909). Über die Nachkommenschaft der *Solanum*-Pfropfbastarde und die Chromosomenzahlen ihrer Keimzellen. Zts. f. Bot. 2: 1-38.
19. — (1916). Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. ibid 8: 417-531.

Explanation of Plate 3

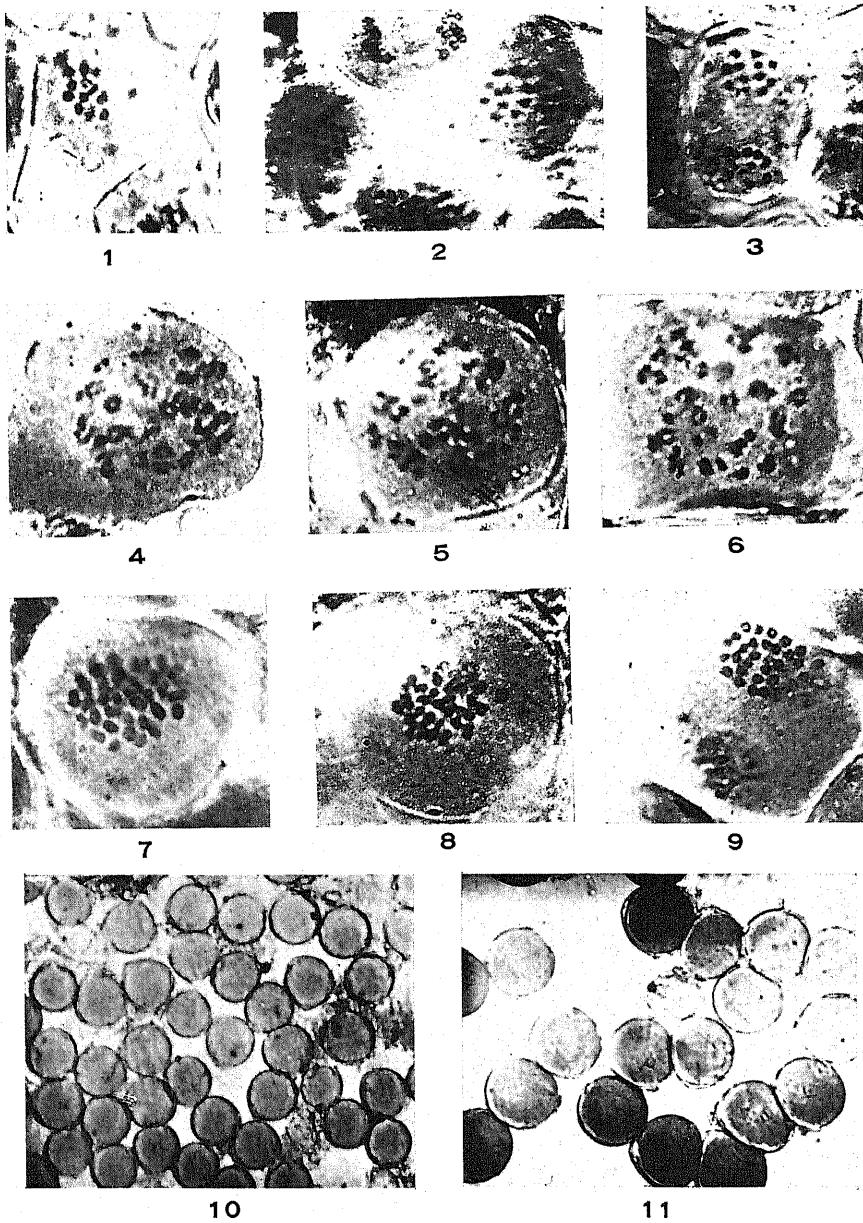
All the photomicrographs were taken by the aid of LEITZ's "Macca" attachable camera from the smeared preparations which were stained with aceto-carmin. Figs. 1-9 were taken at the combination of ZEISS AP. 120 objective and K. 15 ocular. They were enlarged to give a magnification of ca 1,400 on reproduction. Figs. 10-11 were taken at the combination of ZEISS AP. 40 objective and K 15 ocular, giving a magnification of ca 300.

Figs. 1-3. Meiosis of the pollen mother cells of *S. photeinocarpum*. 1. The first metaphase, illustrated in Text-fig. 7; 2, the first anaphase, showing normal division of chromosomes; 3, the second metaphase, illustrated in text-fig. 9.

Figs. 4-9. Meiosis of the pollen mother cells of *S. nigrum*. 4-6, diakinesis, showing the occurrence of quadrivalents, hexavalents and bivalents, illustrated in Text-figs. 11-13; 7, the first metaphase with 36 bivalents, illustrated in Text-fig. 14; 8, the first metaphase, showing that some of the chromosomes closely assemble in three, illustrated in Text-fig. 15; 9, the second metaphase with tripartite and dipartite chromosomes, illustrated in Text-fig. 18.

Fig. 10. Pollen grains of *S. photeinocarpum*.

Fig. 11. Pollen grains of *S. nigrum*.



Nakamura: Cyto-genetical Studies in the Genus *Solanum*. I. Autopolyploidy of *Solanum nigrum* LINN.

Umkehrbare Entmischung der Kernkolloide nach Vitalfärbung und Plasmolyse

Von

Otto Bank

Aus dem Institut für allgemeine Biologie der Masarykuniversität
in Brünn

I

STRUGGER (1933) konnte einwandfrei zeigen, daß die Kernstrukturen reversible Entmischungsformen des Karyotins sind. Bemerkenswert ist, daß saure Vitalfarbstoffe nach demselben Autor nur den Kernsaft färben, nicht aber die Strukturen, basische dagegen das Karyotin. BECKER und BECKEROWA (1933) konnten mit basischen Farbstoffen, bei Benützung des elektrischen Stromes, Chromatin und Nukleolen umkehrbar färben. Gleichzeitig weisen die beiden Autoren darauf hin, daß die bisher durchgeführten Vitalfärbungen des pflanzlichen Zellkernes (GICKLHORN 1927; ALBACH 1929; BANK 1933) mit sauren sowie mit basischen Farbstoffen (BANK 1933) nur an sehr stark pathologisch veränderten Kernen gelungen ist, wenn man nach dem Untersuchungen verschiedener Autoren (MARTENS 1927; SHARP 1929; TELEŻYŃSKI 1930; NEBEL 1932, u. a. zitiert nach BECKER u. BECKEROWA) die netzartige Struktur der *Allium*-Kerne als die normale betrachtet. Nun scheint mir (BANK 1936) durch die Arbeit STRUGGERS (1933) das Problem der Normalstruktur des Kernes in viel beweglicherem und einschlägigerem Sinne gelöst zu sein, demzufolge die jeweilige Struktur Funktion ist gewisser Lebensbedingungen (pH, Salzkonzentration). Daher war es auf Grund dieser Erkenntnis notwendig, experimentell zu überprüfen, inwieweit namentlich der Einwand BECKER und BECKEROWAS stichhältig ist, daß die von mir mit basischen Farbstoffen mit Hilfe der Plasmolyse gefärbten Kerne in ihrem Chromatinanteil verändert sind. Diese Überprüfung schien umso interessanter zu werden, als die mit basischen Farbstoffen bei gleichzeitiger Plasmolyse gefärbten Kerne in ihrer Färbung reversibel sind (BANK 1935). Es bleibt dabei unbestritten, daß durch die zur Erzielung der Vitalfärbung mit der von mir angewandten Methode neue, von den normalen verschiedene Gleichgewichte im behandelten lebenden Systeme (BERTALANFFY) eintreten können. Fraglich bleibt jedoch, ob diese Veränderungen gerade den Chromatinanteil des Kernes betreffen müssen, was BECKER u. BECKEROWA für die Erklärung der von mir erhaltenen Diffusfär-

bung des Kernes, mit basischen Farbstoffen erzielt, für wichtig zu halten scheinen. Es könnte im Sinne des vorher Gesagten das gesamte Kernsystem, vielleicht auch das Zellsystem in einer typischen Weise verändert sein, was die Diffusfärbung bedingte. Und so wird in der vorliegenden Mitteilung der Nachweis zu erbringen versucht, daß das Chromatin in den von mir vitalgefärbten Kernen tatsächlich in reversibel strukturierbarer Form im Kerne vorhanden ist, daß somit die diffuse Vitalfärbung der Kerne mit basischen Farbstoffen in plasmolysierten Zellen auf einer Veränderung der Gleichgewichte im lebenden System beruht und nicht auf dem Mangel eines bestimmten Stoffes, lies: des Chromatins.

II

Versuchsmaterial: Zellen der inneren Epidermis von *Allium cepa*.

Nach langen Vorversuchen gelang es, dieses sichere Behandlungsrezept zu finden das analog ist jenem, das angewandt worden ist um in der Zellsaftvakuole Entmischungen zu erzielen: die Epidermen werden für 10–15 Minuten in ein Gemisch von 1 mol KCl und 0.1% Methylviolett (1:1) eingelegt. Nach dieser Zeit sind die Kerne in den plasmolysierten Zellen diffus blau gefärbt. Auf dem Deckglase, bei mikroskopischer Beobachtung, wird 1 mol KSCN zugesetzt, worauf, nach einer Wirkungsdauer von einigen Minuten, die Kerne violett werden und die umkehrbare Entmischung von Nukleolen und Körnern eintritt.

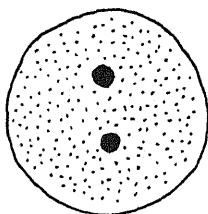


Fig. 1. Ein körnig entmischter Zellkern nach diffuser Vitalfärbung. Körner und Nukleolen sind mit Farbstoff besetzt, die Zwischensubstanz ist farblos.

III

(A) Bei weiterer Beobachtung der entmischten Kerne sehen wir, daß Körner (Granula) und Nukleolen wieder verschwinden, daß die Kerne glasig werden und schließlich, bei gleichzeitiger, sehr feinkörniger Entmischung platzen. Das ist der erste (1) Modus der umkehrbaren Entmischung der mit dem basischen Farbstoffe diffus gefärbten Kerne.

Wir besitzen noch einen zweiten (2) ohne notwendig tödlichen Ausgang: sofort nach dem Erscheinen der Nukleolen und Körner im vorhin diffus gefärbten Kerne, übertragen wir die Zellen in reine 1 mol KCl-Lösung. Nach einiger Zeit sind die Kerne wieder diffus blau geworden und können durch Zugabe von 1 mol KSCN-Lösung in wiederum reversibler Weise körnig entmischt werden. Durch rechtzeitigen Wechsel der beiden Lösungen (KCl u. KSCN) gelingt es, diese reversible Entmischung zu wiederholen. In mehreren Fällen

konnte ich das dreimal erzielen. Weiter konnte diese Wiederholung nicht getrieben werden, weil die Zellen doch leiden und schließlich zugrunde gehen, und zwar aus der entmischten Form auf die unter Modus (1) beschriebene Weise, aus der diffusen Form (ohne Körner u. Nukleolen) direkt durch Platzen bei gleichzeitiger, uns schon bekannter, sehr feinkörniger Entmischung.

Außerdem können die Entmischungskörner durch verstärkte Plasmolyse zum Verschwinden gebracht, durch Deplasmolyse wieder erzeugt werden. Diese Behandlung ist jedoch ziemlich schwierig.

(B) Es ist somit sicher, daß der mit einem basischen Farbstoffe in der plasmolysierten Zelle diffus gefärbte Kerninhalt reversibel zu Körnern entmischbar ist. Trotzdem normalerweise bei der von uns beschriebenen Entmischungsmethode mit den Körnern auch die Nukleolen erscheinen, könnten Zweifel auftauchen, ob denn die entstandenen Körner auch tatsächlich aus chromatischer Substanz, wenigstens dem Hauptanteile nach, bestehen. Diese Zweifel zu beheben, scheinen wir in der Methode STRUGGERS (1930), der reversiblen Retikulumdarstellung im Zellkern, ein Mittel zu besitzen. Bekanntlich gelingt es, in bestimmt konzentrierten KNO_3 -Lösungen das Kernretikulum im *Allium*kern darzustellen oder es unsichtbar werden zu lassen. Dasselbe gelingt auch in gleichkonzentrierten KCl-Lösungen, die für unsere Zwecke von besonderer Wichtigkeit sind. So können wir in Konzentrationen von etwa 0.05 mol Kerne ohne Retikulum, jedoch mit sichtbaren Nukleolen darstellen, in Konzentrationen von etwa 0.17 mol erhalten wir Kerne mit Retikulum und Nukleolen, in Konzentrationen von 0.4 mol erhalten wir ganz homogene Kerne ohne Retikulum und ohne Nukleolen. Es ist also anscheinend die Möglichkeit gegeben, in vorher ganz bestimmt strukturierten und hierauf gefärbten Kernen (1) die Lokalisation des Farbstoffes festzustellen und (2) in gefärbten Kernen mit vorhandenem Retikulum die Kernkolloide zu entmischen versuchen, wobei das etwaige Mißlingen der Entmischung in solchen Kernen mit einer gehörigen Vorsicht als Beweis dafür gelten kann, daß die unter (A) beschriebenen Entmischungskörner zu großem Teil aus chromatischer Substanz bestehen.

Die praktische Durchführung dieser Möglichkeiten ist leider schwieriger und nicht so eindeutig wie man im Vorhinein anzunehmen geneigt wäre. Denn die Applikation der Farbstofflösung im Gemisch mit niedrig konzentrierten Salzlösungen, dazu noch auf bereits behandelte Zellen, wirkt sehr giftig, außerdem wirkt eine 0.17 mol Salzlösung im Gemisch mit 0.1% Methylviolett anders als die reine Salzlösung. Wir erhalten somit nur „launische“ Resultate, Resultate mit großer Variationsbreite: aus gleichem Gemisch (etwa 0.17 mol

KCl + Methylviolett) erhalten wir nach derselben Wirkungsdauer einmal diffus gefärbte, das anderemal Kerne mit gefärbter körniger Struktur. Die Entmischung mit gleichmolarer KSCN-Lösung ist nicht so sicher zu erhalten wie bei der bei (II) beschriebenen Behandlung. Sicher jedoch ist soviel, daß in Kernen mit körniger Struktur auf keinen Fall eine zweite Entmischung stattfindet, während sie in diffus gefärbten Kernen zu erzielen ist. Wichtig aber ist, daß die körnige gefärbte Struktur der Kerne durch Plasmolyse zum Verschwinden gebracht werden kann. Weiter muß erwähnt werden, daß in den diffus gefärbten Kernen aus dem Gemisch 0.05 mol KCl + 0.1% Methylviolett (1:1) mit 0.05 mol KSCN keine Entmischung erzielt werden konnte, so daß es den Anschein hat, als wäre die Entmischung nach unserer Methode erst von einer bestimmten höheren Konzentration ab zu erzielen.

Obwohl, wie aus dem Berichteten ersichtlich, die gestellte Aufgabe nicht klar gelöst werden konnte, können wir schon jetzt mit einigem guten Recht annehmen, daß die Entmischungskörner wenigstens teilweise aus jener Substanz bestehen (dem Karyotin) die bei STRUGGERS Methode das Kernretikulum bildet und die von BECKER u. BECKEROWA in Anlehnung an die schon genannten Autoren als Chromatin bezeichnet wird.

(C) Diese Annahme wird durch die nun zu berichtenden Versuchsergebnisse bestätigt. Bevor wir jedoch darüber berichten müssen wir weiter ausholen: es ist selbstverständlich, daß das unter II angegebene und bis jetzt angewandte Behandlungsrezept der Zwiebelepidermen auf seine Berechtigung näher untersucht wurde. Daher wurde die Wirkung anderer in ihrer kernfärberischen Wirkung ähnlicher Farbstoffe wie Gentiana und Kristallviolett, Prunepure, Malachitgrün, Neutralrot außerdem die Wirkung anderer dem Farbstoffe beigemischter Salze untersucht. Es waren dies: NH_4NO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , K_2SO_4 ; NH_4Cl , LiCl , NaCl . Als Entmischungssalz wurde außerdem noch NH_4SCN benützt.

Bei Verwendung aller Chloride als Beimischungssalze zu Methylviolett erhalten wir bei Einwirkung von KSCN als auch von NH_4SCN gleich prompte und zuverlässige Ergebnisse. Auch bei Verwendung der Sulfate erhalten wir eine gute reversible Granulation der Körner, wenn wir die Zellen nach der Behandlung im Farbstoff-Salz Gemisch etwa 1 Stunde lang in reiner SO_4 -Lösung baden. Dieses Zwischenbad einzuschalten ist deshalb notwendig, weil die Kerne ansonsten stäbchenförmig strukturiert sind (Fig. 2).

Sehr schwierig ist es, körnige Entmischung der Kernkolloide zu erhalten, wenn dem Methylviolett irgendein Nitrat beigemischt

wird. In diesem Falle muß nach der Färbung bei gleichzeitiger Plasmolyse ein mindestens 24 Stunden dauerndes Zwischenbad in reiner Salzlösung ($-\text{NO}_3$ oder $-\text{Cl}$) eingeschaltet werden, um bei Anwendung des KSCN reversible körnige Entmischung des diffus gefärbten Kernes zu erzielen. Wir können jedoch, um solche Entmischung rascher zu erhalten, die plasmolysierten Zellen mit diffus gefärbtem Kerne in etwa 2 mol KNO_3 stärker plasmolysieren. Dann wird bei Verwendung des KSCN ziemlich prompt die körnige Entmischung erzielt. Das zeigt, daß zur Erzielung der reversiblen Entmischung der Kernkolloide das gesamte System in ein bestimmtes labiles Gleichgewichtssystem gebracht werden muß, ein Gleichgewichtssystem, in das die Entmischungssalze leicht eingreifen, es stören und ein neues Gleichgewichtssystem bereiten können. Da außerdem die stärkere Plasmolyse in der 2 mol Lösung der Bereiter einer solchen notwendigen Labilität ist, ließ sich aus der Ordnung in der HOFFMEISTERSchen Reihe erwarten, daß das NH_4SCN , in seiner Wirkung stärker als das KSCN, die Entmischung der Kernkolloide, die mit NO_3 -Farbgemischen behandelt worden, auch ohne Zwischenschaltung langer bis 24 Stunden dauernder Wartezeiten oder stärkere Plasmolyse, direkt hervorrufen werde. Die Erwartung wurde bestätigt: bei Verwendung des NH_4SCN werden die mit Nitrat-Farbstoffgemischen behandelten Kerne sofort, wie in Fig. 2 angegeben, entmischt.

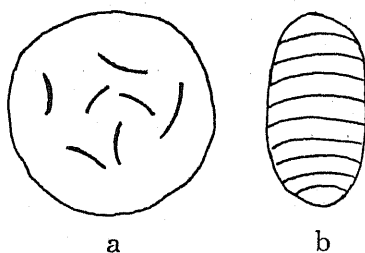


Fig. 2. Stäbchenförmige Entmischung des vorher vital diffusgefärbten Zellkernes. Die Stäbchen sind gefärbt, die Zwischensubstanz ist farblos. Die Bedingungen unter welchen die Form a und unter welchen die Form b erhalten werden kann, kann vorläufig nicht angegeben werden.

Weil die Formen der Entmischungsbildungen labil sind—körnig bei Verwendung des KSCN, stäbchenförmig bei Benützung des NH_4SCN —und weil sie in ungefähr gleicher Gestaltung bei der STRUGGERSchen Behandlungsmethode erzielt werden, können wir auf ihren Karyotinanteil rückschließen.

Zur Stützung dieses zweiten Wahrscheinlichkeitsbeweises über die Verwandtschaft der Entmischungskörner mit dem Karyotin kann ich noch zwei direkte Beobachtungen anführen:

(a) Zellkerne der *Allium*-Epidermiszellen wurden mit 0.1% Eosin (5cc) + 0.75% Essigsäure (5 Tropfen) gefärbt und dann in 0.1% Methylenblau + Na_2SO_4 (in Spuren) übertragen. Nach einiger Zeit zeigt der vorhin homogene, diffus gefärbte Kern ein farbloses Kernretikulum (Karyotin) mit gefärbter Karyolymphe. Diese Zellen

KCl + Methylviolett) erhalten wir nach derselben Wirkungsdauer einmal diffus gefärbte, das anderemal Kerne mit gefärbter körniger Struktur. Die Entmischung mit gleichmolarer KSCN-Lösung ist nicht so sicher zu erhalten wie bei der bei (II) beschriebenen Behandlung. Sicher jedoch ist soviel, daß in Kernen mit körniger Struktur auf keinen Fall eine zweite Entmischung stattfindet, während sie in diffus gefärbten Kernen zu erzielen ist. Wichtig aber ist, daß die körnige gefärbte Struktur der Kerne durch Plasmolyse zum Verschwinden gebracht werden kann. Weiter muß erwähnt werden, daß in den diffus gefärbten Kernen aus dem Gemisch 0.05 mol KCl + 0.1% Methylviolett (1:1) mit 0.05 mol KSCN keine Entmischung erzielt werden konnte, so daß es den Anschein hat, als wäre die Entmischung nach unserer Methode erst von einer bestimmten höheren Konzentration ab zu erzielen.

Obwohl, wie aus dem Berichteten ersichtlich, die gestellte Aufgabe nicht klar gelöst werden konnte, können wir schon jetzt mit einigem guten Recht annehmen, daß die Entmischungskörner wenigstens teilweise aus jener Substanz bestehen (dem Karyotin) die bei STRUGGERS Methode das Kernretikulum bildet und die von BECKER u. BECKEROWA in Anlehnung an die schon genannten Autoren als Chromatin bezeichnet wird.

(C) Diese Annahme wird durch die nun zu berichtenden Versuchsergebnisse bestätigt. Bevor wir jedoch darüber berichten müssen wir weiter ausholen: es ist selbstverständlich, daß das unter II angegebene und bis jetzt angewandte Behandlungsrezept der Zwiebelepidermen auf seine Berechtigung näher untersucht wurde. Daher wurde die Wirkung anderer in ihrer kernfärberischen Wirkung ähnlicher Farbstoffe wie Gentiana und Kristallviolett, Prunepure, Malachitgrün, Neutralrot außerdem die Wirkung anderer dem Farbstoffe beigemischter Salze untersucht. Es waren dies: NH_4NO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , K_2SO_4 ; NH_4Cl , LiCl , NaCl . Als Entmischungssalz wurde außerdem noch NH_4SCN benützt.

Bei Verwendung aller Chloride als Beimischungssalze zu Methylviolett erhalten wir bei Einwirkung von KSCN als auch von NH_4SCN gleich prompte und zuverlässige Ergebnisse. Auch bei Verwendung der Sulfate erhalten wir eine gute reversible Granulation der Körner, wenn wir die Zellen nach der Behandlung im Farbstoff-Salz Gemisch etwa 1 Stunde lang in reiner SO_4 -Lösung baden. Dieses Zwischenbad einzuschalten ist deshalb notwendig, weil die Kerne ansonsten stäbchenförmig strukturiert sind (Fig. 2).

Sehr schwierig ist es, körnige Entmischung der Kernkolloide zu erhalten, wenn dem Methylviolett irgendein Nitrat beigemischt

wird. In diesem Falle muß nach der Färbung bei gleichzeitiger Plasmolyse ein mindestens 24 Stunden dauerndes Zwischenbad in reiner Salzlösung ($-\text{NO}_3$ oder $-\text{Cl}$) eingeschaltet werden, um bei Anwendung des KSCN reversible körnige Entmischung des diffus gefärbten Kernes zu erzielen. Wir können jedoch, um solche Entmischung rascher zu erhalten, die plasmolysierten Zellen mit diffus gefärbtem Kerne in etwa 2 mol KNO_3 stärker plasmolysieren. Dann wird bei Verwendung des KSCN ziemlich prompt die körnige Entmischung erzielt. Das zeigt, daß zur Erzielung der reversiblen Entmischung der Kernkolloide das gesamte System in ein bestimmtes labiles Gleichgewichtssystem gebracht werden muß, ein Gleichgewichtssystem, in das die Entmischungssalze leicht eingreifen, es stören und ein neues Gleichgewichtssystem bereiten können. Da außerdem die stärkere Plasmolyse in der 2 mol Lösung der Bereiter einer solchen notwendigen Labilität ist, ließ sich aus der Ordnung in der HOFFMEISTERSchen Reihe erwarten, daß das NH_4SCN , in seiner Wirkung stärker als das KSCN, die Entmischung der Kernkolloide, die mit NO_3 -Farbgemischen behandelt worden, auch ohne Zwischenschaltung langer bis 24 Stunden dauernder Wartezeiten oder stärkere Plasmolyse, direkt hervorrufen werde. Die Erwartung wurde bestätigt: bei Verwendung des NH_4SCN werden die mit Nitrat-Farbstoffgemischen behandelten Kerne sofort, wie in Fig. 2 angegeben, entmischt.

Weil die Formen der Entmischungsbildungen labil sind—körnig bei Verwendung des KSCN, stäbchenförmig bei Benützung des NH_4SCN —und weil sie in ungefähr gleicher Gestaltung bei der STRUGGERSchen Behandlungsmethode erzielt werden, können wir auf ihren Karyotinanteil rückschließen.

Zur Stützung dieses zweiten Wahrscheinlichkeitsbeweises über die Verwandtschaft der Entmischungskörner mit dem Karyotin kann ich noch zwei direkte Beobachtungen anführen:

(a) Zellkerne der *Allium*-Epidermiszellen wurden mit 0.1% Eosin (5cc) + 0.75% Essigsäure (5 Tropfen) gefärbt und dann in 0.1% Methylenblau + Na_2SO_4 (in Spuren) übertragen. Nach einiger Zeit zeigt der vorhin homogene, diffus gefärbte Kern ein farbloses Kernretikulum (Karyotin) mit gefärbter Karyolymphe. Diese Zellen

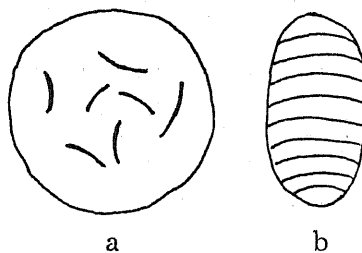


Fig. 2. Stäbchenförmige Entmischung des vorher vital diffusgefärbten Zellkernes. Die Stäbchen sind gefärbt, die Zwischensubstanz ist farblos. Die Bedingungen unter welchen die Form a und unter welchen die Form b erhalten werden kann, kann vorläufig nicht angegeben werden.

übertragen wir in 1 mol KCl. Nach einiger Zeit verfeinert sich das Retikulum, die Nukleolen treten stark hervor. Schließlich zerfällt das Retikulum zu Körnern, diese verschwinden und der Kern wird homogen. Bei eingeschalteter Deplasmolyse erscheint das Kernretikulum wieder.-[Konnte nicht wiederholt werden da in anderen Fällen das Kernretikulum bei Plasmolyse nicht zu Körnern zerfällt sondern sich vergrößert, wobei der Kern gänzlich gelifiziert, bei gleichzeitigem Anstieg des Brechungsindex.]

(b) Kerne der *Allium*-Epidermiszellen wurden in Prune pure 0.1% + 2 mol KCl gefärbt (diffus). Nach Auswaschen in reiner 2 mol KCl-Lösung werden in das Gemisch 0.1% Methylenbau + 2 mol KCl (1:1) übertragen. Nach 24 Stunden ist der Kern entfärbt. Die Zellen werden in 2 mol KCl (3 ccm) + 0.75% Essigsäure (3 Tropfen) übertragen. Die Kernkolloide werden stäbchenförmig entmischt, die Stäbchen zerfallen nach einiger Zeit zu Körnern.

(D) Genauso wie sich nicht alle Salze gleichmäßig gut zur durchzuführenden reversiblen Entmischung des in gleichzeitig plasmolysierten Zellen vitalgefärbten Kernes eignen, eignen sich auch nicht alle Farbstoffe dazu. Besonders bemerkenswert ist das Verhalten der 3 sehr verwandten Farbstoffe Kristallviolett, Gentianaviolett und Methylviolett zusammen mit 1 mol KCl als plasmolysierenden Beimischungssalz. Mit Kristallviolett gefärbte Kerne können nur mit NH_4SCN entmischt werden, wobei nur ganz wenige Körner entstehen; KSCN ist ganz wirkungslos. Gentianaviolett-Kerne können sowohl mit NH_4SCN als auch mit KSCN entmischt werden, dabei sehr leicht mit NH_4SCN , während KSCN eine nur geringe Menge von Entmischungskörnern gibt. Methylviolett-Kerne entmischen sich gleich gut mit beiden Entmischungssalzen. Eine fundierte Erklärung für das verschiedene Verhalten dieser 3 Farbstoffe kann zur Zeit nicht gegeben werden. Prune pure mit KCl vermischt eignet sich zu unseren Entmischungsversuchen überhaupt nicht.

Aus der Arbeit STRUGGERS (1933) geht hervor, daß (1) die sauren Farbstoffe die Karyolymphe, die basischen das Karyotin färben und (2) daß die sauren Farbstoffe im sauren Gebiet ($\text{I E P} = 3,83-4,04$ bzw. $4,40-4,49$) aus der Karyolymphe in das Karyotin wandern. In unserem Falle, da durch die Plasmolyse der basische Farbstoff nicht im Karyotin sondern in der Karyolymphe gespeichert wird, war es jedenfalls interessant zu prüfen, ob die Entmischung durch Änderung der elektrischen Ladung beeinflusst wird. Dazu habe ich mich zweier Methoden bedient (a) der Ansäuerung des Mediums durch 0.5% Essigsäure, (b) durch Ausnützung der elektrischen Gruppenregel, des sogenannten Kalium-Natriumkontrastes (KELLER). Bekanntlich gehören zur Kaliumgruppe, d.i. zu jenen Salzen die aus

der Froschhaut auswandern, die also biologisch negativ sind (in Auswahl):

Basenfarbstoffe sehr stark verdünnt > NH_4 - Salze > Kalisalze > Magnesiumsalze in starker Verdünnung, Sulfate und Phosphate.

Zur Natriumgruppe, d.i. zu jenen Salzen, die in der Froschhaut von außen nach innen wandern d.h. biologisch positiv sind, gehören: Wasser, Säurefarbstoffe besonders in angesäuerter Lösung, Lithiumsalze > Natronsalze > Rhodanide > Chloride > Bromide.

Da die Entmischung nach unserer Methode besonders gut gelingt, wenn wir Chloride als Beimischung zum Methylviolett verwenden, und da sie durch Rhodanide, ebenso durch Bromide erzielt werden kann, schien es, als sollte der Natrium-Kaliumkontrast bei der Hervorrufung der beschriebenen Erscheinungen eine besondere Rolle spielen, wenn man annimmt, daß gleichsinnige Wirkung der einzelnen Behandlungskomponenten günstig ist zur Erzielung des angestrebten Resultates. Allerdings steigen schon bei bloßer Betrachtung des schon beschriebenen Versuchsergebnisses verschiedene Bedenken auf: denn (1) wirken nicht nur Chloride, die in die Natriumgruppe gehören, entmischungsfördernd, ebenso wirken auch die in die Kaliumgruppe gehörigen Sulfate; (2) es widerspricht auch der theoretischen Erwartung, daß das NH_4SCN stärker wirkt als das KSCN obwohl jenes der Ordnung in der Gruppe nach negativer ist als dieses. Doch könnte diese Mißstimmung auch so erklärt werden, daß die Form der Entmischungsbildungen von der sonst gewohnten, körnigen abweicht; bekanntlich kommt es in beiden eben angeführten Fällen wenigstens vorübergehend zu Stäbchenbildung.

Wir können uns von der Giltigkeit des Kalium-Natriumkontrastes auf verschiedene Weise überzeugen. Ich habe dazu zwei Möglichkeiten herausgegriffen: (1) bei Behandlung der Zellen mit KNO_3 - u. NaNO_3 -Methylviolettgemischen konnte bei Anwendung des Entmischungssalzes erwartet werden, daß in den NaNO_3 -Kernen die Entmischung früher eintritt als in den KNO_3 -Kernen. Die Beobachtung lehrt, daß diese Erwartung nicht eintritt. (2) Narkose senkt die Potentialdifferenzen (KELLER 1936). Daher dürfte Zugabe von Narkoticis zum Entmischungssalz die Entmischung verzögern. Zugabe von 2% Äther zu KSCN zeigt im Eintritt der Entmischung keine zeitliche Differenz gegenüber der Wirkung reinen KSCN .

Wir kommen zum Schluß, daß am Zustandekommen der Entmischung im mit Methylviolett diffus gefärbten Kerne der plasmolysierten Zelle die elektrostatischen Ladungen keinen primären Anteil besitzen dürften. Dafür zeugt auch der Umstand, daß auch durch das KSCN keine Änderung des Resultates festzustellen war.

Eigentlich überrascht diese Tatsache nicht sonderlich, wenn wir

z.B. an den Mechanismus der Vitalfärbung des Kernes zurückdenken. Da ist es, mindestens bei Färbung mit Eosin, so (BANK) daß der bis dahin unsichtbare Zellkern sich zuerst optisch differenziert, bevor er den Farbstoff zu speichern beginnt (siehe auch KAMNEW 1934 für Neutralrot). Es verändert sich also zuerst das Gleichgewicht der Zelle, damit vielleicht zusammen die einzelnen elektrostatischen Ladungen, worauf erst der Farbstoff gespeichert wird. Ich erachte es daher nicht für ganz genau, den Zellkern allgemein als anodisch zu bezeichnen, sondern ich möchte vielmehr einengen, daß der optisch differenzierte Zellkern anodisch ist. Über seine elektrischen Eigenschaften im optisch nicht differenzierten Zustand können wir vorläufig schwerlich etwas Positives aussagen.

In Erwägung aller berichteten Tatsachen können wir die vorläufig wohl am wenigsten gewaltsame Schlussfolgerung ziehen, daß die körnige Entmischung der Kernkolloide nicht nur physikalisch sondern mindestens zu großen Teile chemisch bedingt ist. Der genaue Mechanismus der zur Entmischung führt bleibt unbekannt.

Zusammenfassung

1. Die Kernkolloide der Epidermiszellen von *Allium cepa* im Gemisch 1 mol KCl + 0.1% Methylviolett (1:1) vital diffus gefärbt, können durch KSCN körnig und reversibel entmischt werden (Fig. 1).

2. Die Körner können einigemal (bis zu 3 mal) erzeugt und wieder zum Verschwinden gebracht werden.

3. Als Beimischungssalz zum Methylviolett eignen sich auch andere Chloride: NaCl, LiCl, NH_4Cl ; schwieriger findet die Entmischung statt, bei Verwendung von Sulfaten (Na_2SO_4 , $/\text{NH}_4/2 \text{SO}_4$), und sehr schwer gestaltet sich die Entmischung, wenn Nitrate (KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Ca}/\text{NO}_3/2$) dem Farbstoff beigemischt werden.

4. Die Entmischung nach der Nitratbehandlung kann leichter gemacht werden (a) durch vorhergehende verstärkte Plasmolyse (2 mol Lösungen) der Zellen oder (b) durch Verwendung von NH_4SCN als Entmischungssalz. In diesem Falle kommt es jedoch nicht zu körniger sondern zu stäbchenförmiger Entmischung (Fig. 2).

5. Auch eignen sich nicht alle Farbstoffe zur Hervorrufung der körnigen Entmischung. Prune pure ist gänzlich untauglich. Kristallviolett gibt mit KCl als Beimischung schwache körnige, reversible Entmischung nur bei Anwendung von NH_4SCN als Entmischungssalz, mit KSCN gibt es keine Entmischung; Gentianaviolett mit KCl gibt mit KSCN schwache, mit NH_4SCN gute Entmischung, Methylviolett gibt sowohl mit KSCN als auch mit NH_4SCN gute Entmischung.

6. Beim Zustandekommen der Entmischung gilt der Kalium-Natriumkontrast nicht. Es wird die Annahme ausgesprochen, daß chemische Affinitäten neben den physikalischen Eigenschaften eine sehr beachtenswerte Rolle spielen dürften.

7. Es wird der Beweis dafür zu führen gesucht, daß bei vitaler Diffusfärbung des Kernes mit basischen Farbstoffen—bei gleichzeitiger Plasmolyse—diese Färbungsart nicht durch Änderung des Chromatinanteiles des Kernes, sondern durch Veränderung des phasischen Gleichgewichtes im Kerne bedingt wird.

Schrifttum

- Albach W., Protoplasma 5, 1929 ; 412.
 Bank O., Protoplasma 18, 1933 a ; 620.
 — Protoplasma 19, 1933 b ; 125.
 — Protoplasma 25, 1936 a ; 188.
 — Verhandlungen d. Naturforsch. Ver. Brünn 67, 1936 b ; 107.
 Becker W. A. u. Beckerowa Z., Acta Soc. Bot. Poloniae 11, 1934 ; 367.
 Bertalanffy L. V., Theoretische Biologie I. Borntraeger Berlin 1932.
 Gicklhorn J., Protoplasma 2, 1927 ; 1.
 Keller R., Der elektrische Faktor der Ernährung. S. Karger-Verlag, Berlin 1936.
 Martens P., Cellule, 38, 1927 ; 67.
 Sharp L. W., Bot. Gazette 88, 1929 ; 249.
 Strugger S., Protoplasma 10, 1930 ; 363.
 — Planta 18, 1933 ; 561.
 Teleżyński H., Acta Soc. Bot. Poloniae 7, 1930 ; 381.

A Gynandromorph in *Drosophila* Produced by Double Fertilization

By

Richard Goldschmidt

University of California, Berkeley, California

It is well known that the majority of gynandromorphs in *Drosophila* are derived from XX-eggs from which at some stage one X has been eliminated. But there are a few cases on record in which the distribution of marking genes to the male and female parts of the body lead to the assumption that gynandromorphism has been produced by double fertilization of a binucleated egg by two sperms. These cases have been completely reviewed by L. V. Morgan and C. Stern. As a matter of fact, such cases cannot be regarded as doubtful occurrences any more, since Goldschmidt and Katsuki proved the occurrence of hereditary gynandromorphism in the silkworm (also one case in *Lymantria*) on the basis of double fertilization of the female pronucleus and one of the reduction nuclei, the so-called Richtungskern. In *Drosophila*, however, this type seems to be rather rare, which justifies the description of a new case. It closely resembles two cases described by L. V. Morgan (p. 229), but is superior to them in one feature of the analysis.

This gynandromorph appeared in a backcross of a female with attached X-chromosomes both carrying yellow and autosomes marked by the genes bw (brown II), e^s (sooty III) and ey (eyeless IV). The father of the backcross was a hybrid between a female of the same constitution and a male carrying the gene r (rudimentary) within the X-chromosome. The gynandromorph is almost completely bilateral: left male, sooty and rudimentary; right female, yellow, normal wings. The lines of demarcation between male and female parts are very sharp in the anterior part of the body. In the thorax and scutellum the black-yellow border line coincides exactly with the median. But the color of the tip of the abdomen is male, the genital armature mixed.

There can be no doubt that the female half contains the \widehat{XX} from the mother. But as none of the autosomal recessive genes are visible, the sperm responsible for the female parts must have contained the normal allelomorphs of these genes and in addition the Y-chromosome. There can further be no doubt that the male parts contained the paternal X-chromosome with the rudimentary gene. As the male half was sooty it must have received from both

parents the gene e^s , i.e., ♀ nucleus Y bw e^s ey X ♂ nucleus $v^r + e^s +$. Therefore this part of the body as well as the other must be the product of fertilization, but with a different type of sperm. This proves that two sperm cells have fertilized two egg nuclei and, further, that these two nuclei were the product of a reduction division: $\widehat{XXY} \rightarrow \widehat{XX} + Y$. (There would be the alternative of haploid development of one sperm nucleus; thus far nothing points to the possibility of such an event.) This was, then, the origin of the gynandromorph:

Egg N. I. Y bw e^s ey x sperm $X_{(r)} + e^s +$
 Egg N. II. \widehat{XX} bw e^s ey x sperm Y + + +.

Literature

- Goldschmidt, R. (1923) Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis des Gynandromorphismus. Biol. Cbl. 43.
 — u. Katsuki, K. (1927-31) Erblicher Gynandromorphismus und somatische Mosaikbildung bei *Bombyx mori* L. I-IV. Biol. Cbl. 47, 48, 51.
 Morgan, L. V. (1929) Composites of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Washington Publ. 399.
 Stern, C., u. Sekiguti, K. (1931) Analyse eines Mosaikindividuums bei *Drosophila melanogaster*. Biol. Cbl. 51.

Karyotype Alteration and Phylogeny, I. Analysis of karyotypes in Aloinae with special reference to the SAT-chromosome¹⁾

Dyûhei Satô

Tokyo Imperial University

Introduction

The karyotypes of Aloinae have been reported by many investigators (cf. Taylor 1924, 1925; Ferguson 1926; Johansen 1929; Fernandes 1931; Heitz 1931 a, b, 1935b; Tuan 1931; Geitler 1934, 1935; Marshak 1934; Matsuura and Sutô 1935; Resende 1936). The plants of this group are generally diploid having a basic number of four long and three short chromosomes, while only rarely are there found tetraploids (cf. Ferguson 1926), and hexaploids which will be dealt with in the present paper.

Taylor (1925) showed in his work on the karyotypes of three genera of Aloinae, *Aloe*, *Gasteria* and *Haworthia* that in the former two genera a pair of long chromosomes was found which have satellites at their distal end, while in the last genus no satellited chromosomes were detected; that the satellited chromosome of *Gasteria* has a subterminal constriction, while the constriction of *Aloe* was situated more distally than that in *Gasteria*. Heitz (1931a, 1935b) indicated in the case of *Aloe arborescens* and *A. ferox* that each of them has not merely two but four satellites and four nucleoli corresponding. Tuan (1931) and Geitler (1934, 1935) found only one satellite in the haplophase of the plants of this group. Based on his observation of one satellite and two nucleoli in *Aloe humilis* var. *equinata*, *Gasteria cheilophylla*, *G. angustifolia*, *G. depressa*, *G. 'prolifera'* and *Apicra* sp. Geitler declared himself opposed to Heitz's view that the number of satellited chromosomes corresponds to that of the nucleoli. Recently, Resende (1936) supported Heitz's hypothesis of SAT-chromosomes from his observation in 102 Aloinae species of which each has four satellites and four nucleoli corresponding except three species which have two satellites and two nucleoli corresponding respectively.

The present study was undertaken in order to analyse and compare the karyotypes in Aloinae from the stand point of karyotype

1) Contributions from the Divisions of Plant-Morphology and of Genetics, Botanical Institute, Faculty of Science, Tokyo Imperial University, No. 172.

alteration and simultaneously to reexamine Heitz's hypothesis of SAT-chromosomes. The results of the present study showed that the karyotypes in Aloinae are not so definitely distinct according to genera as Taylor (1925) emphasized and are not always so regular in having four satellites and nucleoli as Resende (1936) preliminarily reported. The polyploidy, mixoploidy, elimination, translocation and size difference of chromosomes have been found in three genera and fifty-one species and hybrids of Aloinae which were cytologically investigated. The karyotypes of these plants suggest that many of them may have a hybrid origin.

Materials and Methods

The materials used were all obtained from pot plants most of which were raised from seeds imported by the Koisikawa Botanic Garden of Tokyo Imperial University. For the species name the label of the imported seed bag was adopted in most cases. The root-tips were fixed with Karpechenko's solution and the sections were cut from fifteen to twenty micra in thickness. The preparations were stained after Newton's gentian violet method. The magnification of all of the figures is about 1600 diameters.

Observations

In surveying the literature we find that most of those engaged in observing the number of satellites met with difficulty in detecting satellites in Aloinae, for some satellites have but a small amount of chromatin materials and the strands of the others are too short, these strands connecting them to their mother chromosomes. In the present case, an attempt was made at first to determine the number of nucleoli in the telophase and then the satellites were traced with the expectation of the corresponding number to be found, in order to examine the validity of Heitz's hypothesis of SAT-chromosomes. When a small nucleolus was observed, the satellite was expected to be small or more properly speaking to have a short connecting strand. Accordingly, attention was concentrated on the distal ends of long chromosomes and on the proximal ends of short chromosomes, not only in the metaphase but also in the anaphase and further in the prophase. The observation in the anaphase has been generally believed to be the most favourable for the detection of satellites, but the short connecting strand of the satellite was observed more distinctly in the prophase than in the other stages.

To analyse the karyotypes in Aloinae, the following abbreviation was adopted for the sake of convenience.

L_1 . Long chromosome with the longest proximal arm generally having satellites at the distal arm except in some species of *Aloe*.

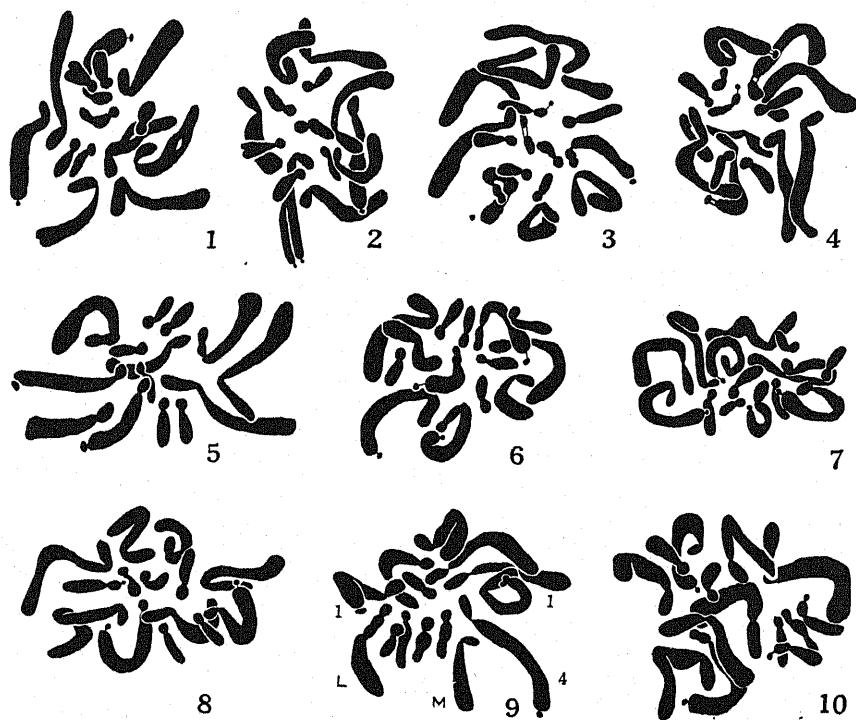
L_2 and L_3 . Long chromosomes with longer proximal arms than the L_4 chromosome. Those in *Aloe* rarely have satellites.

L_4 . Long chromosome with the shortest proximal arm generally having satellites at the distal arm.

S_1 , S_2 and S_3 . Small chromosomes with subterminal constrictions. In *Aloe* the S_3 chromosome rarely has a satellite at the proximal arm.

1. Karyotypes of *Aloe*

The karyotypes were analysed in the following fifteen plants, namely: *A. aristata*, *A. bortiana* (Fig. 3), *A. brevifolia* (Fig. 1), *A. capitata* var. *typica* (Fig. 7), *A. ferox*, *A. gracilis* var. *minima*



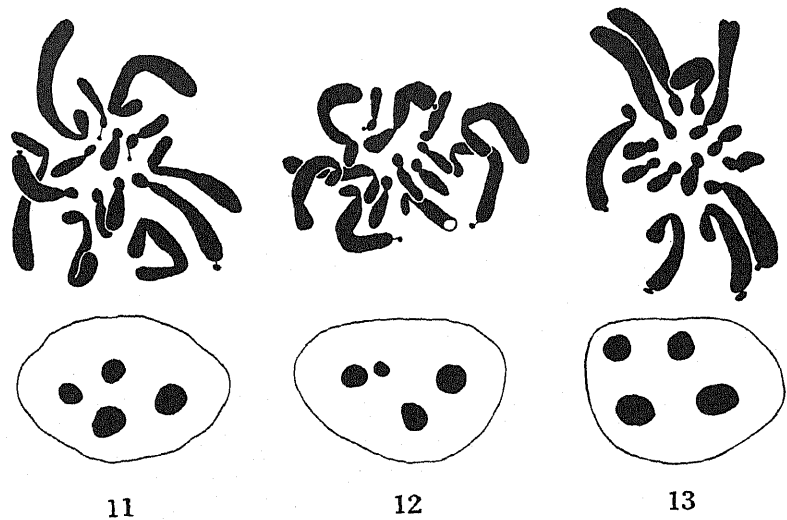
Figs. 1-10. Karyotypes in *Aloe*, SAT-chromosomes are especially shown. 1, *A. brevifolia* $2n = 14 (2L_4)$. 2, *A. humilis* $2n = 14 (2L_4)$. 3, *A. bortiana* $2n = 14 (2L_4 + S_3)$. 4, *A. stricta* $2n = 14 (2L_4 + S_3)$. 5, *A. macrocarpa* $2n = 14 (2L_4)$. 6, *A. speciosa* $2n = 14 (2L_2 + 2L_4)$. 7, *A. capitata* var. *typica* $2n = 14 (2L_3 + 2L_4)$. 8, *A. latifolia* $2n = 14 (2L_4 + S_3)$. 9, *A. gracilis* var. *minima* $2n = 14 (2L_1 + L_4)$. 10, *A. schumperi* $2n = 14 (2L_4 + 2S_3)$. The letters in brackets indicate the SAT-chromosomes. $\times 1600$.

(Fig. 9), *A. humilis* (Fig. 2), *A. latifolia* (Fig. 8), *A. macrocarpa* (Fig. 5), *A. paxii* (Fig. 12), *A. saponaria* (Fig. 11), *A. schumperi* (Fig. 10), *A. speciosa* (Fig. 6), *A. stricta* (Fig. 4) and *A. variegata* (Figs. 13, 40). These species are all diploids and have similar karyotypes ($2n = 14 = 8L + 6S$) (cf. Table 1). Taylor (1925) reported that the longest chromosome (the L_4 chromosome) with an extremely subterminal constriction had a satellite at the distal end in *Aloe arborescens* and *A. saponaria*. Heitz (1931a, 1935b) described two pairs of SAT-chromosomes (the L_1 and perhaps L_4 chromosomes) in *A. arborescens* and *A. ferox*. Taylor's observation of two SAT-chromosomes is in accord merely with observations in the case of *A. brevifolia*, *A. humilis* and *A. macrocarpa*. Heitz's evidence of four long chromosomes with satellites has been confirmed in *A. capitata* var. *typica*, *A. speciosa* and *A. variegata*. More exactly speaking, the SAT-chromosomes of *A. capitata* var. *typica* are two L_3 and two L_4 chromosomes and those of *A. speciosa* are two L_3 and two L_4 chromosomes and those of *A. variegata* are two L_1 and two L_4 chromosomes. In addition to these various karyotypes, *A. saponaria* and *A. schumperi* have four SAT-chromosomes i.e., two L_4 and two S_3 chromosomes with satellites and *A. bortiana*, *A. latifolia* and *A. stricta* have three SAT-chromosomes i.e., two L_4 and S_3 chromosomes. *A. gracilis* var. *minima* has three SAT-chromosomes i.e., two L_1 and one L_4 chromosomes and *A. paxii* has four SAT-chromosomes i.e., one L_1 , two L_4 and one S_3 chromosomes, and *A. aristata* has four SAT-chromosomes i.e., one L_1 , one L_3 and two L_4 chromosomes.

The number of satellited chromosomes is in accord with the corresponding number of nucleoli found in the telophase in the species mentioned above except in *A. aristata* and *A. ferox*. The karyotype of *A. ferox* could not be determined on account of the insufficiency of the examined materials. *A. aristata* has five nucleoli of which one is very small. Four SAT-chromosomes i.e., the L_1 , L_3 and $2L_4$ chromosomes could be observed instead of five. This discrepancy may be attributed to the absence of favourable plates rather than to the invalidity of the hypothesis of SAT-chromosomes.

Three satellited chromosomes in *A. bortiana*, *A. latifolia* and *A. stricta* may be derived either from the elimination of the satellite of the S_3 chromosome or from the hybridization between species with four SAT-chromosomes and species with two ones. The karyotype of *A. paxii* ($L_1 + 2L_4 + S_3$) can be explained by the hybridization between two species with different SAT-chromosomes $\{(2L_1 + 2L_4) + (2L_4 + 2S_3)\}$ or by the translocation of satellites (Figs. 11-13).

A. gracilis var. *minima* (Fig. 9) has a peculiar karyotype i.e.,



Figs. 11-13. Relation between SAT-chromosomes and nucleoli in the telophase of *Aloe* species. 11, *A. saponaria* $2n = 14$ ($2L_4 + 2S_3$). 12, *A. paxii* $2n = 14$ ($L_1 + 2L_4 + S_3$). 13, *A. variegata* $2n = 14$ ($2L_1 + 2L_4$). $\times 1600$.

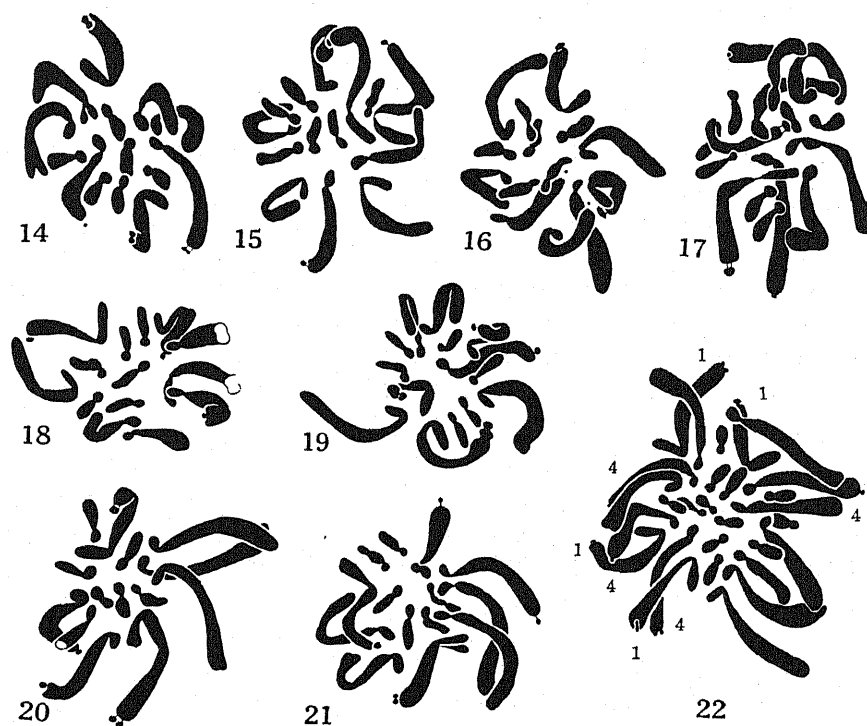
eight long, one medium and five short chromosomes instead of eight long and six short chromosomes as in other *Aloe* species. The medium chromosome may be derived from the long chromosome (L_4 ?) by fragmentation. The karyotype suggests the translocation of the distal end of the long chromosome to the short chromosome (S_3 -Ld) in favourable preparations. But this inference can not be verified merely by the karyotype analysis without observation being made on the chromosome pairing in meiosis. Occurrence of three SAT-chromosomes in this species suggests the elimination of the satellite of the L_4 chromosome in the course of a chromosome alteration such as translocation.

Table 1. Karyotype analysis in *Aloe*

Plant name	Chromosome number ($2n$)	SAT-chromosome	Nucleoli at telophase
<i>A. aristata</i>	$8L + 6S = 14$	$(L_1 + L_3 + 2L_4 = 4)$	5
<i>A. bortiana</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 + S_3 = 3$	3
<i>A. brevifolia</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 = 2$	2
<i>A. capitata</i> var. <i>typica</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_3 + 2L_4 = 4$	4
<i>A. ferox</i>	$8L + 6S = 14$	—	4
<i>A. gracilis</i> var. <i>minima</i>	$8L + M + 5S = 14$	$2L_1 + L_4 = 3$	3
<i>A. humilis</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 = 2$	2
<i>A. latifolia</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 + S_3 = 3$	3
<i>A. macrocarpa</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 = 2$	2
<i>A. paxii</i>	$8L + 6S = 14$	$L_1 + 2L_4 + S_3 = 4$	4
<i>A. saponaria</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 + 2S_3 = 4$	4
<i>A. schumperi</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 + 2S_3 = 4$	4
<i>A. speciosa</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_2 + 2L_4 = 4$	4
<i>A. stricta</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_4 + S_3 = 3$	3
<i>A. variegata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4

2. Karyotypes of *Gasteria*

The karyotypes were analysed in the following fifteen plants i.e., *G. acinacifolia* (Fig. 42), *G. amstrangii* (Fig. 18), *G. 'aruhero'* (Fig. 20), *G. brachyphylla* (Fig. 17), *G. brevifolia* (Fig. 14), *G. carinata*, *G. cheilophylla* (Figs. 15, 35-37), *G. disticha* var. *comprucata*, *G. maculata* (Fig. 22), *G. multipunctata* (Fig. 19), *G. nigricans* (Fig. 25), *G. obscura* (Fig. 24), *G. planifolia* (Fig. 16), *G. verrucosa* var. *latifolia* (Fig. 41) and *G. vittata* (Fig. 21) (cf. Table 2). The somatic chromosome number was fourteen in the root-tip cells of the species mentioned above except in the case of tetraploid (or autotetraploid) *G. maculata* which had twenty-eight chromosomes. The diploid species generally have four satellited chromosomes and correspondingly four nucleoli in the telophase. The longest chromosome with subterminal constriction (the L_1 chromosome) generally has a large satellite at the distal end, while one of the long chromosome with extremely subterminal constriction (the L_4 chromosome)



Figs. 14-22. Various karyotypes in diploid and tetraploid *Gasteria*. 14, *G. brevifolia* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 15, *G. cheilophylla* No. 2 $2n = 14 (2L_1 + L_4)$. 16, *G. planifolia* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 17, *G. brachyphylla* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 18, *G. amstrangii* $2n = 14 (L_1 + 2L_4)$. 19, *G. multipunctata* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 20, *G. 'aruhero'* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 21, *G. vittata* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 22, *G. maculata* $2n = 28 (4L_1 + 4L_4)(4b)$. $\times 1600$.

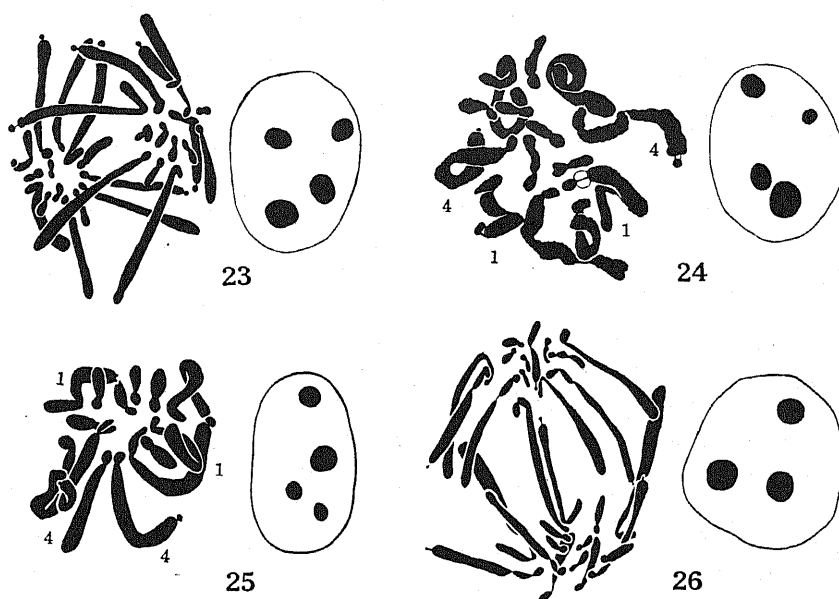
generally has a small satellite. Taylor (1924, 1925) reported one pair of satellited chromosomes because he was able to detect merely one pair of the longest chromosomes with large satellites but overlooked another pair of long chromosomes with satellites. The size difference between the two kinds of satellite is always constant in each species, but varies to a considerable extent according to the species examined. The difference between the two kinds of satellites in *G. multipunctata* and *G. 'aruhero'* is small, while there is a considerable difference between them in the case of *G. planifolia* and *G. acinacifolia*.

The elimination of satellites was observed in *G. amstrangii* and *G. cheilophylla* No. 2. The large satellite of the longest chromosome (L_1) was eliminated in the former, while the small satellite of the long chromosome (L_4) was eliminated in the latter (cf. Table 2). Translocation occurred in *G. cheilophylla* No. 1 (Figs. 35, 36) and a new chromosome with two satellites was formed. The distal end of the L_1 chromosome may possibly be translocated to the proximal end of the L_4 chromosome.

The somatic doubling of chromosomes was observed in *G. brevifolia* and *G. cheilophylla* No. 1 (Fig. 37). The eight satellites could be observed in *G. cheilophylla* No. 1 (Fig. 37), but only four satellites could be distinguished in *G. brevifolia*, for the other four satellites were far too small to be easily detected. The two new chromosomes with two satellites were clearly demonstrated in *G. cheilophylla* No. 1, but this metaphase plate showed sixteen long and eleven short chromosomes instead of sixteen long and twelve short chromosomes as expected. Other metaphase plates showed also such elimination of one short chromosome, but normal somatic doubling of chromosomes could be ascertained in more basal tissue of this root. *G. maculata* has twenty-eight chromosomes i.e., sixteen long and twelve short chromosomes and eight long chromosomes have satellites at the distal ends respectively.

The karyotypes of *Gasteria* are generally similar to each other but the difference in the chromosome sizes can be detected by close attention and exact measurement. This difference may be easily recognized by the comparison of the karyotypes of *G. multipunctata* and *G. amstrangii*.

The existence of the satellites is expected by reason of the observation of nucleoli in the telophase in accordance with Heitz's hypothesis of SAT-chromosomes. When there is a small nucleolus, a satellite with small chromatin material or rather a satellite with short connecting strands can be expected to exist. Accordingly, had heteromorphic nucleoli been observed, heteromorphic satellites might



Figs. 23-26. Karyotypes shown more clearly in the anaphase and prophase. The intimate relation between SAT-chromosomes and nucleoli in the telophase is seen in these figures. 23, *G. multipunctata* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 24, *G. obscura* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 25, *G. nigricans* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 26, *H. 'kinzyd'* $2n = 14 (L_1 + 2L_4)$. $\times 1600$.

have been expected to exist as shown especially in *G. obscura* and *G. nigricans*. Even the size of the satellites suggests that the species may be heterozygous and of hybrid origin. *G. carinata* has two large

Table 2. Karyotype analysis in *Gasteria* and hybrids between *Gasteria* and *Aloe*

Plant name	Chromosome number (2n)	SAT-chromosome	Nucleoli at telophase
<i>G. acinacifolia</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. amstrangii</i>	$8L + 6S = 14$	$L_1 + 2L_4 = 3$	3
<i>G. 'aruhero'</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. brachyphylla</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. brevifolia</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. carinata</i>	$8L + 6S = 14$	—	4
<i>G. cheilophylla</i> No. 1	$\begin{cases} 8L + 6S = 14 \\ 16L + 12S = 28 \end{cases}$	$\begin{cases} L_1 + L_4 L_1 + L_4 = 3 \\ 2L_1 + 2L_4 L_1 + 2L_4 = 6 \end{cases}$	$\begin{cases} 4 \\ (6)^* \end{cases}$
" No. 2	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + L_4 = 3$	3
<i>G. disticha</i> var. <i>comprucata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. maculata</i>	$16L + 12S = 28$	$4L_1 + 4L_4 = 8$	8
<i>G. multipunctata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. nigricans</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. obscura</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. planifolia</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. verrucosa</i> var. <i>latifolia</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. vittata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>G. 'gyuzetu'</i> \times <i>Aloe variegata</i>	$\begin{cases} 8L + 6S = 14 \\ 16L + 12S = 28 \end{cases}$	$\begin{cases} L_1 + 2L_4 = 3 \\ 2L_1 + 4L_4 = 6 \end{cases}$	$\begin{cases} 3 \\ 6 \end{cases}$
<i>A. variegata</i> \times <i>G. ver.</i> var. <i>latif.</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4

* The number in bracket indicates the maximum number observed.

and two small nucleoli in the telophase, but both one L_1 and one L_4 chromosomes with satellite can be easily identified indicating heterozygous SAT-chromosomes. In the case of somatic doubling, the nucleoli might be expected to increase twofold in number, but this expectation was not realized in the case of *G. brevifolia* and *G. cheilophylla*. In both these cases, five or six nucleoli could easily be found, but the eight nucleoli expected could not be observed, because the observation possible in such chimera tissue was insufficient and the number of nucleoli was too large.

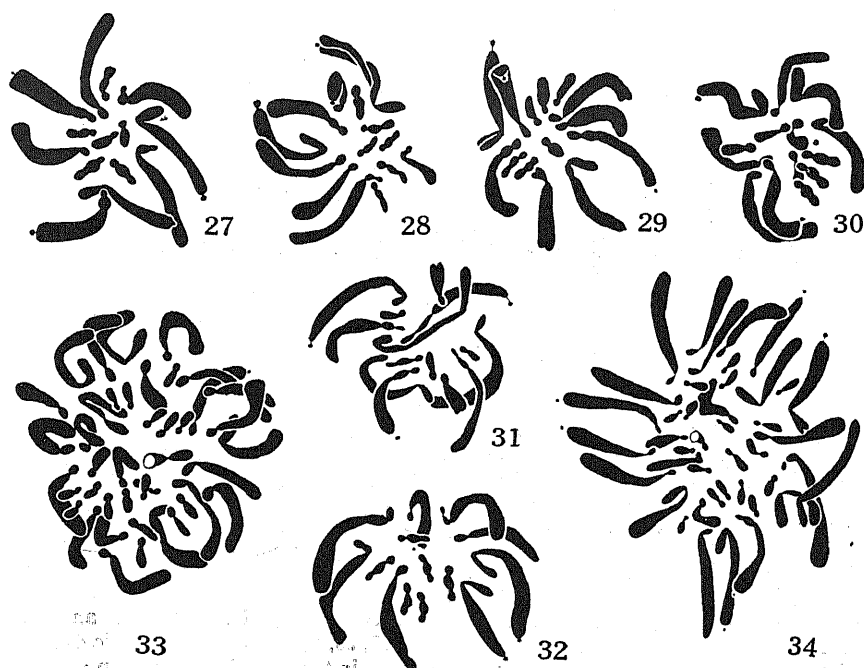
3. Karyotypes of intergeneric hybrids between *Aloe* and *Gasteria*

F_1 hybrids were obtained from the following crosses between *A. variegata* and *G. verrucosa* var. *latifolia*, between *A. variegata* and *G. 'gyuzetu'* and between *G. 'gyuzetu'* and *A. variegata* (cf. Table 2). These hybrids generally showed matroclinous characteristics, but a nature intermediate between both parents was also observed. The difference of reciprocal hybrids is explicitly observed and may be attributed to the cytoplasmic influence (cf. Satô 1936 c).

A. variegata \times *G. verrucosa* var. *latifolia* hybrid has two pairs of SAT-chromosomes and the corresponding four nucleoli in the telophase. *G. 'gyuzetu'* \times *A. variegata* hybrid (Figs. 38, 39) has three SAT-chromosomes and the corresponding three nucleoli and sometimes six SAT-chromosomes and correspondingly six nucleoli in the chimera tissue in which the chromosomes increase twice in number.

4. Karyotypes of *Haworthia*

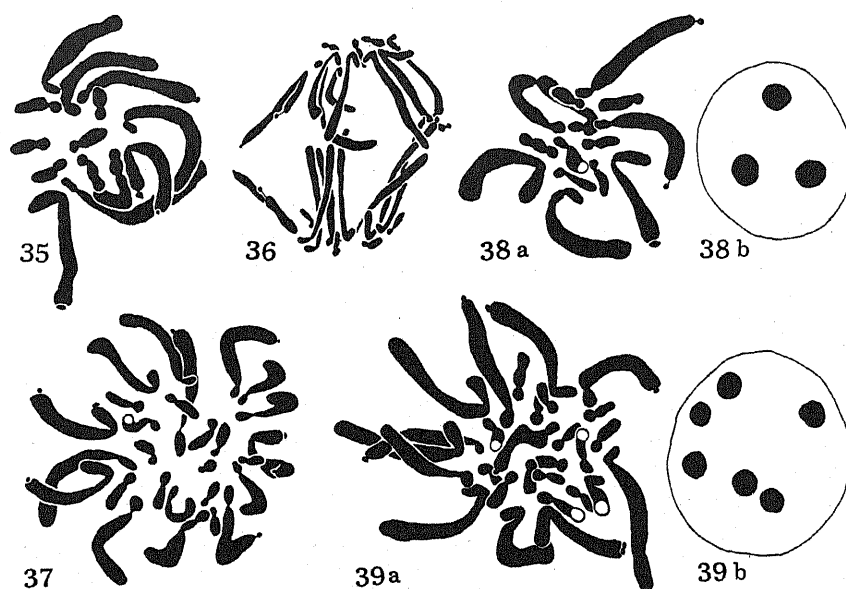
The karyotypes were analysed in the following fifteen species, three varieties and one interspecific hybrid, i.e., *H. attenuata*, *H. caudata* (Fig. 30), *H. cymbiformis* (Fig. 28), *H. fasciata*, *H. faciata* 'hakutei', *H. helos* (Fig. 27), *H. 'kinzyô'* (Figs. 26, 31), *H. margrifer*, *H. margrifer* var. *granata*, *H. mirabilis*, *H. radula* (Fig. 29), *H. Reinwardtii* (Fig. 33), *H. retusa*, *H. spiralis*, *H. subattenuata*, *H. subrigida*, *H. tessellata* (Fig. 34), *H. torquata* (Fig. 32), *H. 'kotobuki'* and *H. retusa*. These plants are diploids and have fourteen chromosomes except *H. Reinwardtii* and *H. tessellata* which are hexaploids and have forty-two chromosomes (cf. Table 3). The karyotypes of *Haworthia* are generally similar to *Aloe* and *Gasteria*, but the sizes of chromosomes and satellites are smaller than those of the two genera mentioned above. The longest chromosome with subterminal constriction (the L_1 chromosome) generally has a large satellite as in *Gasteria* (cf. *H. torquata*, etc.), but the contrary condition seems to



Figs. 27-34. Various karyotypes in diploid and hexaploid *Haworthia*, especially showing SAT-chromosomes. 27, *H. helos* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 28, *H. cymbiformis* $2n = 14 (2L_1 + L_4)$. 29, *H. radula* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 30, *H. caudata* $2n = 14 (L_1 + 2L_4)$. 31, *H. 'kinzyô'* $2n = 14 (L_1 + 2L_4)$. 32, *H. torquata* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 33, *H. Reinwardtii* $2n = 42 (6b)$. 34, *H. tessellata* $2n = 42 (6b)$. $\times 1600$.

exist in *H. spiralis* which may probably belong to *Apicra*. The extremely small satellite can be seen only in a favourable preparation and all the satellites can not always be detected. Supposing that all the satellites had extremely small amounts of chromatin materials, the satellites would not be visible even in apparently ideal plates and could not be observed with certainty. Furthermore the case would sometimes arise in which the satellite might be situated beneath or above the chromosome (artefact phenomena).

The presence of four nucleoli was ascertained in the following plants, *H. attenuata*, *H. fasciata*, *H. fasciata 'hakutei'*, *H. helos*, *H. margriferia*, *H. margriferia* var. *granata*, *H. mirabilis*, *H. radula*, *H. retusa*, *H. spiralis*, *H. subattenuata*, *H. subrigida* and *H. torquata* (cf. Table 3). The satellites exist in every species mentioned above, but four satellites could be clearly observed in *H. fasciata*, *H. fasciata 'hakutei'*, *H. helos*, *H. margriferia*, *H. margriferia* var. *granata*, *H. mirabilis*, *H. radula*, *H. spiralis*, *H. subattenuata* and *H. torquata*. The presence of three nucleoli and the corresponding three satellites was definitely established in *H. caudata*, *H. cymbiformis*, and *H. 'kinzyô'* (cf. Table 3). *H. Reinwardtii* has eight nucleoli as



Figs. 35-39. Somatic mitosis from chimera tissue cells of root-tips in *Gasteria* and intergeneric hybrid. 35-37, *G. cheilophylla* No. 1. 35, 36, $2n = 14$. 37, Somatic doubling and elimination of one short chromosome are seen in the same individual. $2n = 27$. In these figures, the translocation of SAT-chromosomes is apparently recognized. 38, 39, *G. 'gufuzetu' × A. variegata*. 38, $2n = 14 (L_1 + 2L_4)$. 39, $2n = 28 (2L_1 + 4L_4)$. $\times 1600$.

maximum number, but satellited chromosomes could not be observed in a corresponding number. *H. tessellata* has nine nucleoli, while satellited chromosomes were only six in maximum number according to my observations.

Table 3. Karyotype analysis in *Haworthia* and its interspecific hybrid

Plant name	Chromosome number ($2n$)	SAT-chromosome	Nucleoli at telophase
<i>H. attenuata</i>	$8L + 6S = 14$	—	4
<i>H. caudata</i>	$8L + 6S = 14$	$L_1 + 2L_4 = 3$	3
<i>H. cymbiformis</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + L_4 = 3$	3
<i>H. fasciata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. fasciata 'hakutei'</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. helos</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. 'kinzyô'</i>	$8L + 6S = 14$	$L_1 + 2L_4 = 3$	3
<i>H. margifera</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. margifera</i> var. <i>granata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. mirabilis</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. radula</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. Reinwardtii</i>	$24L + 18S = 42$	—	(8)*
<i>H. retusa</i>	$8L + 6S = 14$	—	4
<i>H. spiralis</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. subattenuata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. subrigida</i>	$8L + 6S = 14$	—	4
<i>H. tessellata</i>	$24L + 18S = 42$	—	(9)*
<i>H. torquata</i>	$8L + 6S = 14$	$2L_1 + 2L_4 = 4$	4
<i>H. 'kotobuki' × H. retusa</i>	$8L + 6S = 14$	—	—

* The number in bracket indicates the maximum number observed.

Discussion

1. Comparison and alteration of karyotypes in Aloinae

Taylor (1925) showed the distinction in karyotypes among *Aloe*, *Gasteria* and *Haworthia*, but according to the results of the present observation this is not definite and can be explained by the gradual alteration of karyotypes. He described the two satellited chromosomes ($2L_4$) in *Aloe*, which observation is only confirmed in *A. brevifolia*, *A. humilis* and *A. macrocarpa*, but not in other species which have various karyotypes with different combinations of SAT-chromosomes ($2L_1 + 2L_4$, $2L_1 + L_4$, $2L_2 + 2L_4$, $2L_3 + 2L_4$, $2L_4 + 2S_3$, $2L_4 + S_3$, $L_1 + 2L_4 + S_3$). A similar criticism may be applied to Taylor's conclusion in the case of *Gasteria* and *Haworthia*. The diploid species of *Gasteria* have four satellites with the exception of the peculiar cases (three satellites) of *G. amstrangii* and *G. cheilophylla*, while Taylor reported only two SAT-chromosomes of larger type ($2L_1$). The tetraploid species, *G. maculata* has eight SAT-chromosomes which evidently indicates stableness of this karyotype. In *Haworthia*, Resende (1936) and the writer observed four satellited chromosomes, while Taylor was not able to observe any.

Generally speaking, *Aloe* and *Haworthia* have four long and three short chromosomes in basic number. The comparison of the whole length of chromosomes showed that *Aloe* had the longest chromosome and *Haworthia* the shortest, though the variation of chromosome length in the same genera was found to exist to a considerable extent. The same relation is found in the case of short proximal arms of long chromosomes, i.e., those of *Aloe* are comparatively long and those of *Haworthia* are extremely short and occasionally show a satellite-like shape. At any rate, the resemblance of these karyotypes (including that of *Apicra*) makes undeniable the existence of some phylogenetic relations between these genera.

The karyotype analysis in Aloinae seems to support a hypothesis of Delaunay's "phylogenetische Chromosomenverkürzung" which is assumed to play an important part in species formation. For example, the proximal arms of the long chromosomes of *Aloe* are considerably long, those of *Gasteria* shorter and those of *Haworthia* the shortest, sometimes indicating the appearance of a satellite. This alteration in the karyotype resembles that of the S chromosomes in *Ornithogallum narbonense*, *O. tempskyanum* and *O. obigophyllum* (cf. Delaunay 1926). The SAT-chromosomes in *Aloe* have various combinations according to the species and have the same condition as in *Muscari* among which *M. longipes* has a B. chromosome with satellite at the proximal end, *M. tenuiflorum* has a B. chromosome

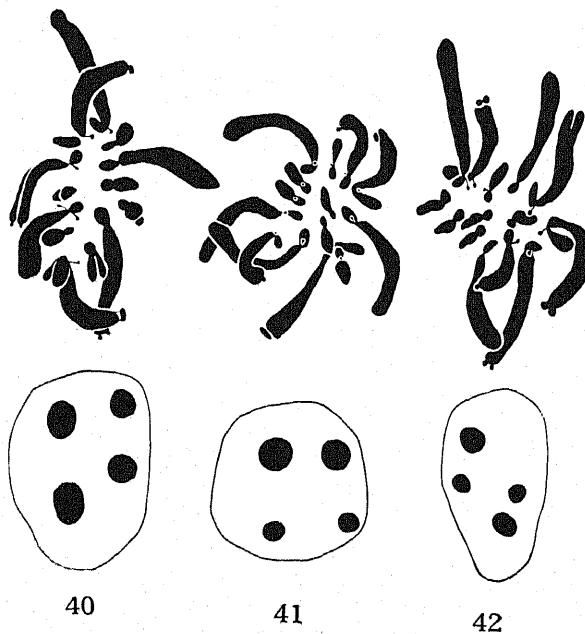
with satellite at the distal end and *M. monstrosum* has a d_1 chromosome with satellite. Delaunay (1926) assumed in the case of *Muscari* that the satellite was the obligatory intermediary product in the process of "Chromosomenverkürzung", but these karyotypes seem to be explained explicitly by the translocation. The writer (1936 a, b) demonstrated clearly the elimination of chromosome and satellite in *Scilla permixta*. Various karyotypes in *Aloe* may be explained by the elimination and translocation of the satellite as in *Scilla*. In *Aloe gracilis* var. *minima* and *Gasteria cheilophylla*, the karyotypes indicated evidently a vestigial trace of translocation.

In addition to the elimination and translocation, the presence of the heterozygous SAT-chromosomes suggests that these karyotypes may be produced by hybridization between the species with different SAT-chromosomes. The karyotypes of *A. paxii* ($L_1 + 2L_4 + S_3$), *G. obscura*, *G. nigricans* and *H. radula* show the result of such hybridization.

2. SAT-chromosomes and nucleoli

Heitz (1931 a, b), after a careful study of the chromosomes of many species of *Vicia* and other genera, concluded that when a chromosome has a satellite, the nucleolus originates on the strand which

connects the satellite to the mother chromosome. Evidence is accumulating to show that chromosomes with satellites, like sex chromosomes, have association with the nucleolus at both meiosis and mitosis (cf. S. Navashin, 1927, Heitz 1931 a, b, 1935b, Gelin and Gustafsson 1932, Geitler 1932, 1934, 1935, Babcock and Cameron 1934, McClintock 1934, Matsuura 1935, Rensende 1936, Westergård 1936, Satô 1936b). SAT-chro-

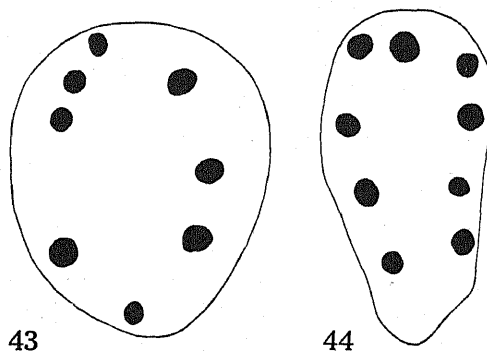


Figs 40-42. Centromeres and satellites are shown with special reference to the nucleoli in the telophase. 40, *A. variegata*. 41, *G. verrucosa* var. *latifolia* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. 42, *G. acinacifolia* $2n = 14 (2L_1 + 2L_4)$. $\times 1600$.

mosomes with a secondary constriction instead of a satellite were reported by various authors to be present in many plants. Matsuura (1935) observed the connection of chromosome with seta to nucleolus in the pollen grain of *Allium Schoenoprasum* var. *typicum*. The present observation in Aloinae supports Heitz's hypothesis of SAT-chromosomes (cf. Table 1-3).

In *Gasteria* and especially in *Haworthia* (Fig. 26), many constricted chromosomes as in *Scilla* (Satô 1936 a, b) with secondary constrictions have no connection to the nucleoli and seem to be essentially different from the so-called secondary constriction of SAT-chromosomes.

The centromere or 'Leitkörperchen' was clearly visible in *Aloe* (Fig. 40) and *Gasteria* (Figs. 41, 42) as in *Podophyllum* (Darlington 1936a) and *Fritillaria* (Darlington 1936b). The shape of the centromere could not morphologically be distinguished from that of the usual satellite found in Aloinae, if the location of the chromatin material was taken into consideration. These centromeres have no connection to the nucleolus. Heitz (1931b) has shown that in *Vicia* nucleoli can arise from non-satellited chromosomes when those with satellites are absent. McClintock (1934) and Creighton demonstrated the formation of a nucleolus or nucleolus-like bodies in *Zea mays* where even the connecting strand of the satellite is absent. In these cases, the centromeres may participate in the formation of nucleoli, but we must wait for further evidence in other materials to solve this problem.



Figs. 43, 44. Nucleoli appearing in the periphery of the telophase nucleus. 43, *G. maculata*, $2n=28$ ($4L_1+4L_4$). Compare with the karyotype in Fig. 22. 44, *H. tessellata*, $2n=42$. Compare with the karyotype in Fig. 34. $\times 1900$.

Summary

In forty-eight plants and three hybrids in Aloinae i.e., thirteen species and two varieties of *Aloe*, twelve species and three varieties of *Gasteria*, two intergeneric hybrids, fifteen species, three varieties and one interspecific hybrid of *Haworthia* (cf. Table 1-3), the karyotypes were analysed from the point of view of karyotype altera-

tion. All these species except three were diploids ($2n = 14$) and have four long and three short chromosomes in basic number. *G. maculata* was tetraploid ($2n = 28$), and *H. Reinwardtii* and *H. tessellata* were hexaploids ($2n = 42$).

Generally speaking, *Aloe* has the longest chromosomes and *Haworthia* the shortest ones. *Gasteria* and *Haworthia* have two pairs of long chromosomes with satellites ($2L_1 + 2L_4$), while *Aloe* has various combinations of SAT-chromosomes (cf. Table 1). These karyotypes were explicitly explained on the basis of karyotype alteration such as elimination and translocation of satellite and subsequent hybridization. Delaunay's hypothesis of "phylogenetische Chromosomenverkürzung" was discussed with special reference to the karyotypes of *Muscari*, *Ornithogalum* and *Aloinae*.

Heitz's hypothesis of SAT-chromosomes was supported by the present analysis of karyotypes in *Aloinae*. The correspondence of the number of SAT-chromosomes and nucleoli in the telophase was clearly demonstrated in forty-three plant forms of *Aloinae* (cf. Table 1-3). The secondary constriction and the centromere were referred to in relation to the nucleolus formation.

The writer wishes to express his cordial thanks to Dr. Y. Sinotô for his helpful suggestions and criticisms in the course of this work.

Division of Genetics, Botanical Institute,
Faculty of Science, Tokyo Imp. University

Literature Cited

- Babcock, E. B. and Cameron, D. R. 1934. Chromosomes and phylogeny in *Crepis* II. The relationships of one hundred eight species. Univ. Calif. Publ. Agr. Sci., 6: 287-324.
- Darlington, C. D. 1936a. The analysis of chromosome movements, I. *Podophyllum versipella*. Cytologia, 7: 242-247.
- 1936b. The internal mechanics of the chromosomes, V. Relational coiling of chromatids at mitosis. Cytologia, 7: 248-255.
- Delaunay, L. N. 1926. Phylogenetische Chromosomenverkürzung. Zeits. Zellforsch. u. mikr. Anat., 4: 338-364.
- Ferguson, N. 1926. The *Aloinae*: A cytological study, with especial reference to the form and size of the chromosomes. Roy. Soc. London Phil. Trans. B., 215: 225-253.
- Geitler, L. 1932. Das Verhalten der Nukleolen in einer tetraploiden Wurzel von *Crepis capillaris*. Planta, 17: 801-804.
- 1934. Grundriss der Cytologie. Borntraeger, Berlin.
- 1935. Beobachtungen über die erste Teilung in Pollenkorn der Angiospermen. Planta, 24: 361-386.
- Gelin, O. E. V. and Å. Gustafsson. 1932. On the occurrence of satellites in meiotic division. Svensk. Bot. Tidsk., 26: 284-291.
- Heitz, E. 1931a. Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nukleolen. Planta, 12: 775-844.
- 1931b. Nukleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. Planta, 15: 495-505.

- Heitz, E. 1935a. Chromosomenstruktur und Gene. Zeits. ind. Abst.- u. Vererb., 70: 402-447.
- 1935b. Die Nukleal-Quetschmethode. Ber. Deut. Bot. Ges., 53: 870-878.
- Johansen, D. A. 1929. The chromosomes of *Aloe macrantha*. Journ. Cactus Succ. Soc. Amer. 1(6): 592-596.
- Marshak, A. 1934. Chromosomes and compatibility in the Aloinae. Amer. Journ. Bot., 21: 592-596.
- Matsuura, H. 1935. On the relation of chromosomes to nucleoli. Bot. and Zool. (Tokyo), 3: 1589-1594.
- and T. Satô. 1935. Contributions to the idiogram study in phanerogamous plants I. Journ. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. V, 5: 33-75.
- McClintock, B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. Zeits. Zellforsch. u. mikr. Anat., 21: 294-328.
- Nawaschin, S. 1927. Zellkerndimorphismus bei *Galtonia candicans* Des. und einigen verwandten Monokotylen. Ber. Deut. Bot. Ges., 45: 415-428.
- Resende, F. 1936. Die SAT-Chromosomen bei den Aloinae (Vorläufige Mitteilung). Ber. Deut. Bot. Ges. 54: 124-126.
- Satô, D. 1936a. Chromosome Studies in *Scilla*, II. Analysis of karyotypes of *Scilla permixta* and allied species with special reference to the dislocation of the chromosomes. Bot. Mag. (Tokyo), 50: 447-456.
- 1936b. Ditto, III. SAT-chromosomes and the karyotype analysis in *Scilla* and other genera. Cytologia, 7: 521-529.
- 1936c. *Aloe variegata* and its intergeneric hybrids. Bot. and Zool. (Tokyo), 4: 1288-1290.
- Taylor, W. R. 1924. Cytological studies in *Gasteria* I. Chromosome shape and individuality. Amer. Journ. Bot., 11: 51-59.
- 1925. Ditto, II. A comparison of the chromosomes of *Gasteria*, *Aloe* and *Haworthia*. Amer. Journ. Bot., 12: 219-223.
- Westergård, M. 1936. On the satellites in the eversporting *Matthiola* races. Compt. Rend. Lab. Carlsb. sér. physiol., 21: 195-204.
-

Meiosis in Several Species of Dioecious Monocotyledoneae I. The possibility of sex-chromosomes

By

Henry Wilhelm Jensen

The dioecious condition of many plants has provided cytologists with the additional task of finding morphological evidence for genetical calculations. One angle of this quest has been the description of sex-chromosomes; until their number may be called legion. It seems obvious that there has been a decided effort to reduce this phenomenon of nature to a matter of mechanics. Such reduction has therefore resulted in the description of many sorts of mechanisms for the determination of sex. From a purely genetical point of view, most of the sex-determining apparatus have appeared quite satisfactory. On the other hand, research from a physiological point of view frequently indicates another type of sex-determination, differences in metabolism, seasonal changes, etc. In the opinion of the author, the cytologist may take a longer view than either the geneticist or physiologist is momentarily willing to give consideration. It is generally conceded among botanists that the dioecious condition has arisen from the hermaphroditic, or perfect, through the polygamous and monoecious forms. We are then faced with the phylogenetic problem of how sex-chromosomes have or could have originated in the sanctum sanctorum of genetical arithmetic. The evidence found in genera where an array of species compass the entire line from perfect to dioecious should give some clue as to the degree of sexual responsibility with which the chromosomes may be charged. Such a study was made by the author, Jensen (2 & 3), with the conclusions that the sex-determining apparatus described by Kihara and Ono (4 & 5), Meurman (6), and others for *Rumex Acetosa*, *R. acetosella*, and other species of *Rumex* had little to do with the direct determination of sex, that the so-called tripartite sex-chromosomes were in reality a "pair of bivalents" whose separation from the spireme has been suppressed so that the two end pieces often acted as one chromosome, that similar apparatus are present during meiosis in related hermaphroditic species which manifest a hybrid origin, and that the abnormalities are simply hybrid irregularities and not significant in the determination of sex. Because the chromosomes of the Monocotyledoneae are often relatively large it was decided to investigate several species of the genus *Smilax* and the wild yam-root.

Dioscorea quaternata (Walt.) Gmel. Mr. E. C. Ogden of Harvard University was kind enough to check the identity of the last named species. These genera are entirely dioecious, but their meiotic behavior might present some evidence relative to the conduct of so-called sex-chromosomes. All the species proved favourable for a study of the pre-meiotic spireme. Such a study is important because the author has found that there is little possibility for synapsis to take place in the genera *Rumex*, *Rheum*, *Fagopyrum*, and *Calycanthus*, Jensen (3). The description of sex-chromosomes must postulate the retention of the individuality of the chromosomes throughout the ontogeny of any individual, evidence to the contrary has its place in this paper.

Material of *Smilax glauca* Walt., *S. rotundifolia* L., and *Dioscorea quaternata* (Walt.) Gmel. was collected from the mountains and coves surrounding the Swannanoa Valley in the Blue Ridge Mts. of North Carolina during the spring of 1936. The material was preserved in Carnoy's fluid, imbedded in hot nitrocellulose after the Jeffrey method, and stained in Heidenhain's iron-alum haematoxylin. The destaining was done very slowly and carefully so as to procure the best possible differentiation of the spireme. Since it is conventionally considered that the male side of the higher plants is heterozygous, only microsporogenesis will be treated in this paper, a study of the female side will follow. Since only the most necessary drawings are figured in the plate, the theoretical implications will be included with the description and discussion of the various phenomena.

During the diplotene stage in *Dioscorea quaternata* the spireme expands out of the synizetic contraction into a continuous, unevenly thickened, much twisted thread. From then on to the stage of diakinesis there is a gradual shortening of the spireme with an increase in thickness in localized regions. Preceding diakinesis the doubleness of the spireme is often obvious. Fig. 1 is a drawing of such a stage showing the doubleness, or two halves, of the spireme and its fundamental continuity. We see the "pairs" connected with other "pairs". This is a very thin section of the nucleus and shows from 12 to 15 of the 27 haploid chromosomes, see Fig. 2 for a count. Six free ends are visible. Since this species has 27 haploid chromosomes, and each chromosome has two ends, one should expect to see some 54 ends in the normal nucleus. However, when a complete nucleus is studied, one has difficulty in finding more than one or two such unjoined ends of chromosomes. Not only do we have here a case of chromosome strings but apparently a fundamental condition of *one continuous spireme* in which the chromosomes originate. In the case of *Smilax glauca*, the early diplotene reveals a similar

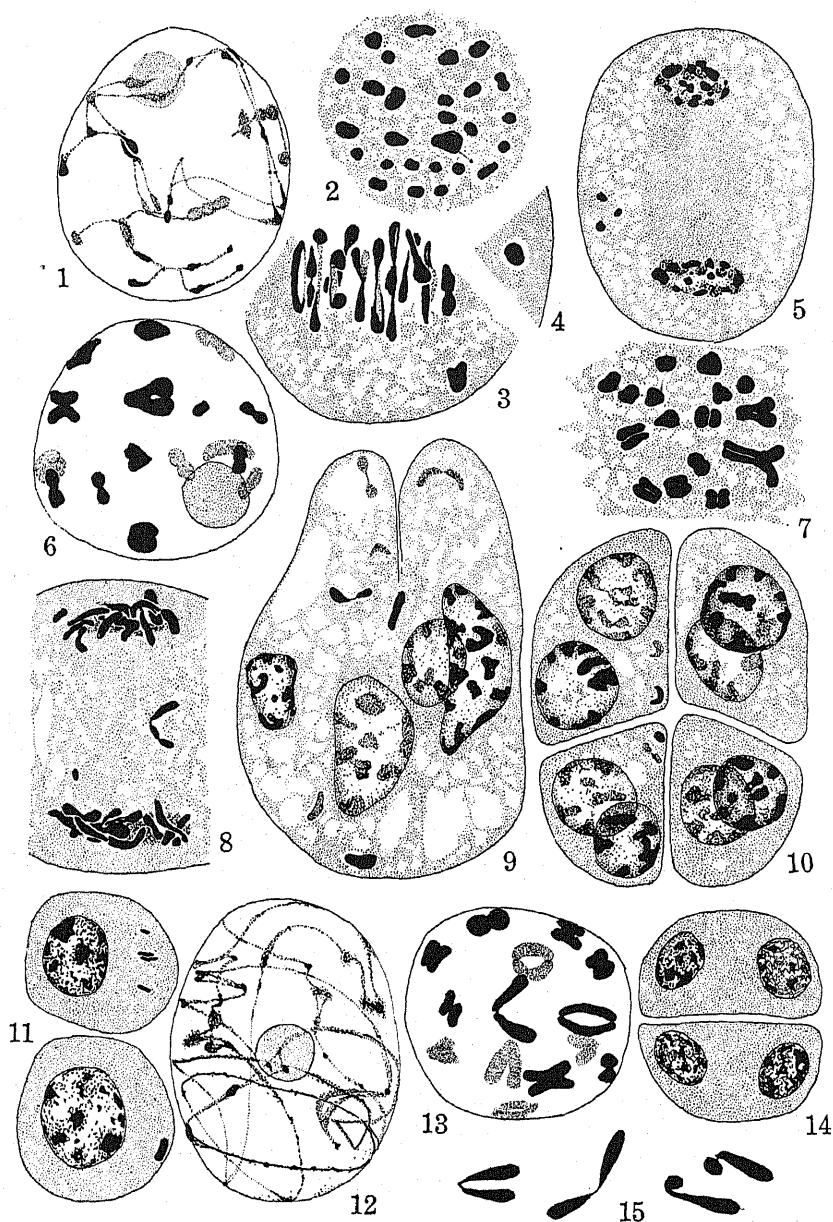
condition. Fig. 12 is a typical nucleus. Though it is apparent on first sight that strands of the spireme wind around the inner surface of the nuclear membrane, it might appear as if there were a number of loose ends, many of them terminating in lumps of chromatin of varying size. However, if the nucleus is studied carefully with a flourite objective, the disjointed appearance of the spireme soon reveals itself to be continuous; the portions being connected by strands which often disappear through other planes of focus. That is to say, if one follows the spireme around carefully, correcting the focus with the fine adjustment of the microscope, the first impression of distinct chromonemata is rapidly resolved into the fact of a continuous spireme. Occasionally one will find a break in the spireme, whether due to cutting or to action within the nucleus is not known, but at no time are there enough loose ends to the chromonemata to even justify a hope that the chromosomes possess an independence through their stainable history in preparation for meiosis. Of course, the reader understands that a drawing, such as figures 1 and 12, which portrays an entire nucleus on a flat surface cannot picture what one might see at any given adjustment of the microscope. Though no evidence for a double spireme was obtained for stages preceding synizesis, the threads of the spireme still appeared continuous. It must be reiterated that if the chromosomes possess an individuality from division to division they ought to show it...., and they do not, in the above mentioned species or a number of other plants which it has been the author's privilege to observe in the laboratories of Dr. Edward C. Jeffrey of Harvard University.

The results of the previous observations negate the possibility of sex-chromosomes, as such, in these species because the chromosomes seem to arise by a lengthwise splitting of a fundamentally continuous spireme which later becomes segmented into the haploid number of chromosomes. Without a retained individuality of the chromosomes, generation after generation, one cannot logically describe sex-chromosomes; and that individuality does not seem to exist. Thus, this type of structural manifestation of genetical factors does not seem to be justified from this cytological point of view.

The character of the reduction division of *Dioscorea quaternata* is peculiar in that a large chromosome, often appearing to possess a satellite, see Fig. 2, fails to behave as the remaining 26 bodies. It may be seen outside the metaphase plate in many cells, usually of an irregular shape, see Fig. 3. During the anaphase and the telophase this odd chromosome often occupies a position along the cell wall, Fig. 4, or may split into three fragments of nearly equal size, as in Fig. 5. This would suggest that this large chromosome is composed

of three separate parts which may or may not disjoin. By counting it was estimated that about a third of the cells displayed this sort of irregularity. This proportion was also applicable to the degree of imperfect pollen. The excluded chromatin gradually disintergrates in the cytoplasm and by the initiation of the second or homeotypic division has disappeared entirely. Except for two minute grains found in one anther sac, no polycary or polyspory seems occur. If the above behavior has any significance it points to a possible unequal distribution of chromatin in the remaining two-thirds of the P.M.C.s, those which behave normally, in that the large chromosome might distribute one of its parts to one daughter nucleus and two to the other. . . . , something on the *Rumex Acetosa* plan. It was impossible to make accurate counts on the second division because the chromosomes become mitotic in appearance and were clumped together in both meta- and anaphase. Regardless of whether one could make out a mechanism for sex-determination in this species, which would not require too much imagination, the fact that a third of the P.M.C.s stand outside the pale of convenient behavior casts a suspicion in their direction. This meiotic irregularity is more significant if taken as indicative of a hybrid ancestry for the species (cf. summary of Jensen (2)) in that similar meiotic irregularities and sterility are typical of known hybrids. The author is not aware of any approved standard of performance required of sex-chromosomes, but it does seem that in the case of *Dioscorea quaternata* the margin of misconduct is too large.

Diakinesis, Fig. 6, and a polar view of the metaphase plate, Fig. 7, of the heterotypic division reveal a haploid count of sixteen for *Smilax rotundifolia*. The reduction division proceeds with regularity. . . . , all the chromosomes divide and two daughter nuclei are formed, and no chromatin is left on the spindle. In preparation for the homeotypic division cytokinesis takes place so that each mitotic figure lies within its own block of cytoplasm. Contrary to the meiotic behavior of most higher plants, the irregularities in *S. rotundifolia* occur in the second division. Nothing phenomenal happens during the metaphase, but upon the initiation of the anaphase one chromosome fails to divide immediately and to have its parts included in the daughter groups and subsequently remains around the central plate, such as in Fig. 8. However, it was noticed that the sister cell originating from the same P.M.C. did not reveal this peculiar type of chromosomal lagging. That such a conduct is generally true may be seen in Fig. 10 wherein are two sets of daughter cells. The related cells are horizontally side by side. It should be noticed that one cell contains no excluded chromatin while



Figs. 1-15. 1-5. *Dioscorea quaternata*. 6-11. *Smilax rotundifolia*. 12-15. *Smilax glauca*. 1. Diplotene, pre-meiotic spireme. 2. Polar view of heterotypic metaphase. 3. Section of metaphase from side. 4. Odd chromosome during heterotypic anaphase. 5. Heterotypic anaphase. 6. Diakinesis. 7. Polar view of first metaphase. 8. Heterotypic anaphase. 9. Abnormal second division. 10. Normal tetrads. 11. Young microspores with excluded chromatin. 12. Early diplotene. 13. Diakinesis. 14. Normal tetrad. 15. Different position of the same chromosome.

the sister cell shows the disjoined halves of one chromosome. This sort of behavior occurs in roughly two thirds of the anthersacs studied. In the remaining third there was no evidence of any irregularity. This sort of meiotic behavior presumably results in an unequal distribution of the chromosomes, two of the tetrad having one chromosome less than the sister pair. Fig. 11 is a drawing of two microspores just after being freed from the old P.M.C. wall and demonstrate typical cases of the excluded chromatin lying within the spore belonging to another nucleus. Micronuclei and resultingly minute spores are not formed in this species. The mechanism just described might be given some sex-determining significance were it not for the difficulty encountered by the gradual reduction in the number of chromosomes which would ensue were such grains used in the production of successful sperm nuclei. One chromosome would be lost in each generation, unless it was replaced by duplication. However, besides the inconvenience of such chromosomal diminution, from a genetical point of view, another fact militates against any sex-determining value for the previously described apparatus. Occasionally one may observe a miscarriage of the usual meiotic process similar to that shown in Fig. 9. Not only has the usual cytokinesis failed, but a number of chromosomes lie free in the cytoplasm. There is also a diversity in the size of the four nuclei. It is interesting to notice that one pair of nuclei are normal in size while the other pair resulting from the second division is the one to suffer the irregularities. This would suggest that some "destructive factor" was segregated during the first division, and bears out the previous observation that there is a difference in the behavior of the two nuclei resulting from the first division. The significance of these cases of partial collapse of the homeotypic division is certainly reminiscent of the meiotic behavior of most hybrids and consequently detracts from any possible affiliation such a mechanism might have with sex-determination. In most of the anthersacs close to half of the pollen was in some stage of degeneracy or lagging development...., presumably the microspores possessing the smaller number of chromosomes. To summarize the situation in the microsporogenesis of *Smilax rotundifolia* we must admit the presence of a very definite inequality in the chromosome complement of the nuclei due to the failure of one chromosome to be included in a half of the daughter nuclei of the second division. The large amount of imperfect pollen, the lagging chromosomes, and the occasional collapse of the second division suggest a record of previous hybridization for the species. The point that the author wishes to make is simply that a numerical difference in the chromosome complement of two daughter nuclei in

a dioecious species is not sufficient grounds on which to assume the existence of sex-chromosomes. The reasons for the previous statement are these...., a tripartite chromosome which will distribute one part to one nucleus and two parts to another is being considered as structural evidence of a sex-determining mechanism, because such a presumption does not collide with the cyto-genetical dogma that chromosomes possess an individuality which is never lost, to say nothing of specificity. However, should an unequal distribution of the chromosomes occur by the discarding of a chromosome into the cytoplasm, such a diminution, because it assails the above mentioned dogma, can not be considered significant, despite the fact that Tahara and Shimotomai (8) and Bremer (1) have demonstrated that a hybrid may duplicate an entire or a portion of a parental set of chromosomes somewhere in the ontogeny of the individual. Furthermore, a numerical difference on the male and female side of the species may not be significant in the determination of sex because it is known that a difference in meiotic behavior may also be found in hermaphroditic forms, Täckholm (7) on canina roses and Jensen (2) on *Rumex*.

Diakinesis in the P.M.C.s of *Smilax glauca* reveals the presence of fourteen haploid chromosomes whose halves are of equal size. The chromosome shown in the center of Fig. 13 often gives the appearance of being made up of two unequal parts. However, all the chromosome "pairs" shown in Fig. 15 are one and the same, but the position of the arms gives different impressions, depending upon the angle. Meiosis is entirely regular in this species, with only the normal tetrad formed, Fig. 14, and no imperfect pollen present though a few retarded grains were seen occasionally. The bearing of the meiotic behavior of this species on the general argument is one of comparison. In this species there is absolutely no evidence of any difference in the chromosome complements among the resulting microspores. Meiosis is perfectly regular, yet *S. rotundifolia* presents abnormalities which might, if compatible with genetical premise, be considered by some as evidence for a sex-determining mechanism among the chromosomes. If the chromosomes possess as much individuality as is currently given them one would expect similar behavior in such closely related species. However, it is not there. We would rather conclude that *S. glauca* gives no evidence of recent hybridization, while *S. rotundifolia* does and that the consequent meiotic irregularities present in the latter have simply been initiated by said hybridization. In conclusion, the author wishes to emphasize that within his observation of the dioecious species of *Rumex* and the three dioecious members of the Monocotyledoneae discussed in this paper he is led

to believe that erroneous views are possible if the cytologist considers that it is his special duty to find structural evidence among the chromosomes for what may be perfectly valid results gained by genetical experimentation. The author is also of the opinion that the meiotic phenomena currently held as significant in the determination of sex will often be found in related hermaphroditic forms were we but as anxious to find them there as we have been in the dioecious species.

Summary

1. The pre-meiotic spireme in the three species studied appears to exist as a fundamentally continuous spireme and gives rise to the meiotic chromosomes by splitting instead of pairing.

2. There is no evidence for a sex-determining apparatus among the chromosomes of said species.

3. The haploid numbers have been counted as follows:

<i>Dioscorea quaternata</i> (Walt.) Gmel.	27
<i>Smilax glauca</i> Walt.	14
<i>S. rotundifolia</i> L.	16

4. Meiotic abnormalities in *Smilax rotundifolia* and *Dioscorea quaternata* are contrasted with various accepted sex-determining apparatus to show that the latter are not justified as such.

Swannanoa, North Carolina, U.S.A.

July 22, 1936

Bibliography

1. Bremer, G. 1923. "A Cytological Investigation on Some Species and Species Hybrids within the genus *Saccharum*." *Gneetica* 5: 97-148, 273-326.
2. Jensen, H. W. 1936. "Meiosis in *Rumex*. 1. Polyploidy and the Origin of New Species" *Cytologia* 7: 1-22.
3. ——— "Meiosis in *Rumex*. 2. The Origin and Behavior of the So-called Sex-chromosomes in *Rumex*." *Cytologia* 7: 23-34.
4. Kihara and Ono, T. 1923. "Cytological Studies on *Rumex* L. 1. Chromosomes of *Rumex Acetosa* L." *Bot. Mag. (Tokyo)* 37: 84-90.
5. ——— 1923. "Cytological Studies on *Rumex* L. 2. On the Relation of Chromosome Number and Sexes in *Rumex Acetosa* L." *Bot. Mag. (Tokyo)* 37: 147-149.
6. Meurman, O. 1925. "The Chromosome Behavior of Some Dioecious Plants and Their Relation with Special Reference to the Sex Chromosomes" *Comment. Biol. Soc. Sci. Fennica* Vol. 2, No. 3.
7. Täckholm, G. 1922. "Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*". *Acta. Horti Bergiani* 7: 97-381.
8. Tahara, M. and Shimotomai, N. 1927. "Bastardierung als eine Ursache für die Entstehung der Chromosomenpolyploidie. I. Bastard zwischen *Chrysanthemum marginatum* und *C. lavendulaefolium*". *Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ. (Series 4)* 2: 293-299.

Beitrag zur Kenntnis der Nuclealreaktion in Pflanzen

Von

A. Kiesel und H. Doinikowa

Aus dem Laboratorium für Pflanzenbiochemie der Universität Moskau

Die Nuclealreaktion hat bei Zellkernforschungen ganz allgemeine Anwendung gefunden und zwar nicht allein für tierische, sondern auch für pflanzliche Objekte. Thymonucleinsäure, richtiger Desoxypentosenukleinsäure, ist dadurch in einer ganzen Reihe pflanzlicher Lebewesen verschiedener systematischer Stellung nachgewiesen worden, wobei jedoch Fälle bekannt wurden, wo die Nuclealreaktion negativ ausfiel.

Eine sehr große Anzahl von Phanerogamen wurde von F. BOAS und O. BIECHELE geprüft. Die meist mit Blattepidermiszellen ausgeführte Nuclealprobe ergab öfters ein negatives Resultat, woraus der Schluß gezogen wurde, daß das Vorhandensein der Desoxypentosenukleinsäure in Pflanzen nicht allgemein ist und für gewisse Pflanzen ein Artmerkmal bildet, also in systematischer Hinsicht auswertbar ist. Bei näherer Betrachtung der sich positiv oder negativ der Nuclealreaktion gegenüber verhaltenden Pflanzen ist jedoch kein sichtbares Verhältnis zum Pflanzensystem zu finden und man erhält eher den unliebsamen Eindruck, es sei der Ausfall der Reaktion einfach von irgendwelchen zufälligen Umständen abhängig. Dies kann uns jedoch keinesfalls zufrieden stellen und in der Suche nach einer annehmbarer Erklärung wäre einige Schuld an der Verwirrung dem Fehlen näherer Angaben über das Alter der geprüften Objekte oder über die Jahreszeit ihres Einsammelns zuzuschreiben.

Die Aufgabe vorliegender Arbeit war unsere Kenntnisse über die Verbreitung der Nuclealprobe in Pflanzen etwas zu erweitern, indem einerseits verschiedene Pflanzengruppen, andererseits verschiedene Organe und Objekte verschiedenen Alters untersucht wurden. In letztem Falle waren die von BOAS und BIECHELE als negativ-nucleal bezeichneten Pflanzen besonders günstige Objekte. Embryonale und aktiv wachsende Pflanzenteile stellten unter Berücksichtigung der Angaben von W. BERG der Aufmerksamkeit besonders wertenes Material vor. Die von J. BRACHET in den Vordergrund gebrachte Frage über die Umbildung der Pentose- in die Desoxypentosenukleinsäure im Lauf der Entwicklung gibt uns ebenfalls Anlaß Altersunterschiede in Betracht zu ziehen.

Wir fixierten unser Material beim Einsammeln mit Alkohol. Die Nuclealprobe wurde genau nach den Angaben von FEULGEN durchgeführt, wobei als positiv nur die im Laufe von 15, höchstens 30 Minuten eintretende Färbung bezeichnet wurde. Die hauptsächlichsten Resultate sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

Tabelle 1

Klasse	Gattung, Art	Organ	
Cyanophyceae	<i>Oscillatorium</i> spec.	Thallus	—
	<i>Tolypothrix</i> spec.	"	—
Chlorophyceae	<i>Cladophora rupestris</i>	"	+
Conjugatae	<i>Spirogyra</i> spec.	"	—
Diatomeae	<i>Rhabdonema</i> spec.	"	+
	<i>Nitzschia</i> spec.	"	+
Phaeophyceae	<i>Pylaiella littoralis</i>	Sporangium	+
		Thallus	+
Rhodophyceae	<i>Polysiphonium urceolatum</i>	"	+
Filicinae	<i>Pteris aquilina</i>	Rhizom	+
	<i>Aspidium filix mas</i>	Wedel	+
Equisetinae	<i>Equisetum hiemale</i>	Unreife Sporen	—
		Sporophyll	+
Lycopodinae	<i>Lycopodium complanatum</i>	Unreife Sporen	—
		Sporophyll	+
Gymnospermae	<i>Ceratozamia miqueliana</i>	Unreife Sporen	—
		Samenanlage	+
	<i>Cedrus libanensis</i>	Macrosporangium	+
	<i>Pinus insignis</i>	Pollen	+
Angiospermae	<i>Allium Cepa</i>	Sproßscheitel	+
		Zwiebelschuppen	+
	<i>Magnolia grandiflora</i>	Fruchtknoten	+
	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Sproßscheitel	+
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Blatt	+
	<i>Pisum sativum</i>	Samenkeim	+
	<i>Soja hispida</i>	"	+
		Junges Blatt	+
	<i>Solanum dulcamara</i>	Samenkeim	+
		Fruchtfleisch	+

Positive Nuclealreaktion wurde in allen untersuchten Pflanzengruppen aufgefunden, so daß wohl von dem Gebrauch der Nuclealreaktion für systematische Zwecke für größere Gruppen nicht die Rede sein kann. Freilich bildete unter den Algenzellkernen der ruhende Zellkern von *Spirogyra* eine Ausnahme. Bekanntlich fehlen diesem Zellkern auch die sonst übliche Kernfärbung mit Farbstoffen. Unser Befund bestätigt die Angaben von PETTA, der zugleich auch bei *Zygnema* das Fehlen der Nuclealreaktion feststellte. Die vorhandenen Angaben von POLJANSKY und PETROUCHEWSKY über die positive Nuclealreaktion bei kernlosen Cyanophyceen konnten wir dagegen nicht bestätigen. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß Alter und Entwicklungsstadium der Zellen in unserem Falle nicht dieselben sein konnten, wie bei den genannten Forschern. Unreife Sporen zeigten sämtlich negative Nuclealprobe an. Dennoch kann bis auf weiteres nicht behauptet werden, daß dies vom Reifungsstadium abhing.

Tabelle 2

	Angaben von BOAS und BIECHELE		Unsere Beobachtung	
	Organ	Nuclealreaktion	Organ	Nuclealreaktion
<i>Pinus silvestris</i>	Nadelblatt	—	Sproßscheitel	+
„ <i>montana</i>	„	—	„	+
<i>Picea excelsa</i>	„	—	„	+
<i>Magnolia pumila</i>	Blatt	—	„	+
<i>Vicia faba</i>	Kotyledonen	—	Samenkeim	+
„	Wurzel	—	Blatt, junge Pflanze	+
<i>Lupinus perennis</i>	Kotyledonen	—	Samenkeim	+
„	Wurzel	—	Keimling, Wurzel	+
„	„	—	Keimling, Blatt	+
„	„	—	Erwachsene Pflanze, Blatt	—, +
<i>Onobrychis sativa</i>	Blatt	—	Blatt	—
„	„	—	Samenkeim	+
<i>Primula obconica</i>	Blatt	—	Staubblatt	+
„	„	—	Pollenkorn	+
„	„	—	Erwachsene Pflanze, Blatt	—, +
<i>Betula alba</i>	Blatt	—	Laubknospe	—
„	„	—	Blatt, jung und alt.	—
„	„	—	Sproß	—
„	„	—	Samen	+

In der Tab. 2 sind einige der von BOAS und BIECHELE als nucleal-negativ gefundene Pflanzen angeführt, bei denen wir dennoch positive Nuclealreaktion erhalten konnten. Außer Blattepidermiszellen wurden von uns auch andere Zellenarten untersucht, wobei Altersunterschiede von Bedeutung waren. Aktiv wachsende und entwicklungsfähige Pflanzenteile zeichneten sich stets durch stärkere positive Nuclealprobe aus, mußten deshalb größere Mengen der uns interessierenden Nucleinsäure im Zellkern enthalten.

Zusammenfassend darf wohl behauptet werden, daß es kaum Pflanzen gibt, denen die Fähigkeit der Desoxypentosenukleinsäurebildung abkommt. Bei allgemeiner Bildung kann es jedoch bestimmte Entwicklungsmomente geben, wo dem Zellkern die genannte Nucleinsäure fehlt. Dadurch wird ihre Bedeutung für das Zellenleben keinesfalls in Zweifel gezogen, es könnte jedoch vermutet werden, daß beim zeitweiligen Fehlen der Desoxypentosenukleinsäure im Zellkern ähnliche Umbildungsvorgänge verlaufen, wie sie von einer Reihe von Forschern für die ihr Reifungsstadium durchlaufenden und befruchteten Eizellen einzelner Tierarten beobachtet und von J. BRACHET analytisch festgestellt sind. Freilich wäre dabei außer der nachgewiesenen Umbildung der Pentose- in die Desoxypentosegruppe auch eine Umbildung der basischen Gruppen aufzufinden. Dies ist mit bedeutend größerer Mühe verbunden, jedoch keinesfalls aussichtslos und verspricht wichtige Aufklärungen für den Zellkernstoffwechsel zu liefern.

Zum Schluß müssen wir auf die Angaben von T. CASPERSSON hinweisen, der den negativen Ausfall der Nuclealreaktion nicht

als einen Beweis des Fehlens von Thymonukleinsäure ansehen will, sondern ihn den störenden Einwirkungen größerer Mengen von Eiweiß zuschreibt. Bei dieser Sachlage könnten nur positiv verlaufende Färbungen maßgebend sein, negative jedoch vollständig wertlos werden. Ob dem auch wirklich so ist, wäre unbedingt nachzuprüfen, wozu die Absorptionsmessung im U.-V. Spektralgebiet nach T. CASPERSSON behilflich sein könnte, die freilich keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Nukleinsäuren gestattet.

Zitierte Literatur

- Berg, W. Zeitschr. f. mikr.-anat. Forschung, Bd. 7, S. 421, (1924).
Brachet, J. Archives de Biologie, T. 44. p. 519 (1933).
Brachet, J. Bullet. d. l. Soc. de chim. biolog., T. 18, p. 305, (1935).
Boas, F. und Biechele, O. Biochem. Zeit. Bd. 254, S. 467, (1932).
Caspersson, T. Biochem. Zeit., Bd. 253, S. 97, (1932).
Caspersson, T. Skandinav. Archiv. f. Physiol. Suppl. N. 8 zum 7 Bd. (1936).
Feulgen, R. und Rossenbeck, H. Zeit. f. Physiol. Chem. Bd. 135, S. 203, (1924).
Petta, H. Compt. rend. de l'acad. d. sc. Paris. T. 197, p. 88, (1933).
Poljansky, G. und Petrouchewsky. Arch. d. Protistenkunde Bd. 67, H. 1, (1929).
-

Chromosome Inversions in *Paeonia suffruticosa*

By

Karl Sax

Arnold Arboretum, Harvard University

Inversions of chromosome segments have been found in *Drosophila*, *Zea*, *Trillium*, and *Paeonia*. Inversions can be detected genetically only when the chromosomes are adequately mapped, and cytologically only in individuals heterozygous for an inverted segment which is long enough to permit crossing over between the inverted and normal chromatids. It is probable that inversions are more common than the present evidence would indicate. We have found occasional meiotic irregularities, caused by inversions, in *Lilium* and in *Tradescantia*.

Inversions have been found in *Drosophila melanogaster*, and are relatively frequent in *D. pseudoöbscura*, where inversions have been found in each of the four chromosomes (Sturtevant and Dobzhansky 1936). Hicks and Stebbins (1934) found fused chromatids and chromatid fragments in the four *Paeonia* species and one hybrid which they examined. The first cytological analysis of inversions was made by McClintock (1933). Two of the inversions studied were found in untreated strains of *Zea*, while one was induced by X-ray treatment. In plants heterozygous for an inversion, the inverted and normal chromosome segments may pair in a homologous association forming a loop (Cf. Fig. 2), or the chromosomes may pair in the form of a rod, in which case the association in the region of the inversion is non-homologous (Cf. Fig. 1). Intermediate conditions and partial pairing also were observed. Crossovers in the loops produced fused chromatids with two fiber attachments and chromatid fragments with no fiber attachments at meiotic metaphase (Cf. Fig. 6).

Crossing over between inverted and normal segments was found in about 12 per cent of the pollen mother cells in a clone of *Trillium erectum* by Smith (1936). Single crossovers in the inverted section produced fused chromatids with fiber attachments at opposite poles; but an additional crossover proximal to the inversion produced a ring chromatid with sister fiber attachments (Cf. Fig. 7).

In individuals heterozygous for inverted segments, the fertility is reduced, crossing over is reduced, and "non-disjunction" of chromosomes is frequent. In *Drosophila* heterozygous inversions give secondary non-disjunction with a frequency which shows a strong

negative correlation with crossing over; and in *Paeonia* partial asynapsis is common. Crossing over in heterozygous inversions can be detected cytologically, but it is difficult to detect genetically because the single crossovers are not recovered (Beadle and Sturtevant 1935).

Inversions in *Paeonia*

Meiotic irregularities indicating heterozygous inversions are frequent in *Paeonia*. In one plant *P. suffruticosa* grown on the Bussey grounds, fused chromatids were found in 12 per cent of the pollen mother cells. The meiotic behavior of this plant has been examined in considerable detail.

There are five pairs of chromosomes in *P. suffruticosa*, one with a subterminal fiber attachment and four with more or less median attachments. The pachytene stage is not favorable for a study of chromosome pairing, but pairing in the Bussey plant seems to be incomplete in most microsporocytes (Photo 1). At meiotic metaphase the chromatids are well differentiated, and the bivalents have an average chiasma frequency of 1.5 (Photo 2). There are five bivalents in most pollen mother cells, but partial asynapsis and univalent formation occur frequently, so that there may be only four, and occasionally only three, bivalents at metaphase. The univalents pass to either pole at random, and seldom fail to be included in the daughter nuclei. Fused chromatids and chromatid fragments were found in 12 per cent of the 1222 pollen mother cells examined. Pollen sterility was 66 per cent in the Bussey plant, but was less than 10 per cent in many of the Arboretum plants.

Fragments are usually associated with fused chromatids, although occasionally fragments were present when no fused chromatids were evident; and in a few pollen mother cells the chromatid bridge was found with no visible fragment. The size of the fragment is directly correlated with the size of the chromatid bridge; the bridge is thick when the fragment is small, and slender when the fragment is large (Photos 3-5). The length of the chromatid fragments varies from less than a micron to more than 9 microns. The frequency distribution of fragment lengths is shown in Table 1.

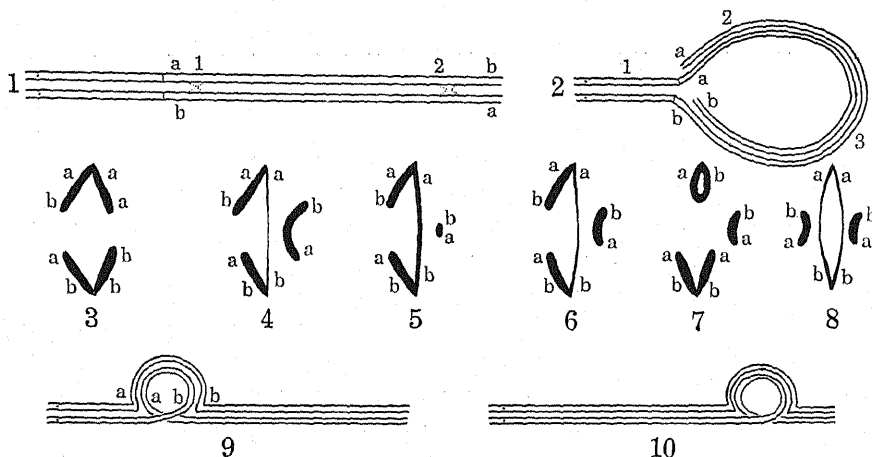
Table 1. Length of fragments in microns

0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	n
11	10	10	8	9	7	4	4	4	1	68

The average length of the chromatid arms at meiotic anaphase is about 5.5 microns for the four isobrachial chromosomes, and about 6.5 for the heterobrachial chromosome. It is evident that

more than 10 per cent of the fragments are longer than a single chromatid arm.

The rather uniform distribution of fragment lengths indicates that more than one inversion is present in the Bussey plant. We have found evidence for at least three heterozygous inversions. In the great majority of cells the fused chromatid involved one of the isobrachial chromosomes (Photo 3), and in one case fused chromatids were found between two pairs of isobrachial chromosomes in the same cell. In about 5 per cent of the inversions the bridge was between the heterobrachial homologues (Photo 6), and fragments were uniformly long. Thus there are inversions in at least three of the five pairs of chromosomes. We have found no case where inversions produced irregularities in both arms of a single bivalent, although occasionally two fragments are present with only one chromatid bridge.



Figs. 1-10. 1. Non-homologous pairing of an inverted and normal segment. The dots represent the spindle fiber attachment points. A crossover at locus 1 will produce an anaphase figure which appears to be normal; but two of the four chromatids carry duplications and deficiencies. The inverted crossover shown at locus 2 would produce fused chromatids and a small fragment, as shown in Fig. 5. An inverted crossover at locus 1 would produce a fused chromatid and a long fragment, as shown in Fig. 4. 2. Homologous pairing of a long heterozygous inversion. In such pachytene loops the size of the fragment will be the same, regardless of the locus of the crossover in the loop. Partially compensating crossovers at loci 1 and 2 will produce a fused ring chromatid and a fragment, while non-compensating crossovers at loci 2 and 3 will produce two fused chromatids and two fragments of equal size (Figs. 7 and 8). These two types of irregularities are very rare in the *Paeony* plant examined. 9. Homologous pairing in a short proximal heterozygous inversion. A crossover in such a loop will produce a fragment nearly twice as long as the normal chromosome arm, as shown in Fig. 4. In *Zea* such short inversions tend to pair non-homologously as rods. 10. Homologous pairing in a short distal heterozygous inversion. A crossover in the loop would produce a fused chromatid and a short fragment. If a loop can move along the chromosome, variations in size of fragments could be obtained from a single chromosome.

The fused chromatids seldom break, as indicated by the fact that fragments usually are accompanied by chromatid bridges. The chromatid bridges occasionally are broken at late anaphase (Photo 7), but usually they persist during the second meiotic division (Photo 11). We have found no loop chromosomes at the first meiotic anaphase, but a few of the bridges at second anaphase may be derived from loops formed by double crossovers (Cf. Fig. 7). The fragment chromatids without fiber attachments are left free in the cytoplasm and do not divide at either the first or second meiotic division.

Heterozygous inversions inhibit chromosome pairing, so that genetic and cytological non-disjunction occur frequently. In the Bussey plant there were five bivalents in 57 per cent of the 236 pollen mother cells examined, four bivalents and two univalents in 41 per cent of the cells, and three bivalents and four univalents in about 2 per cent of the metaphase figures. The univalents usually pass to the poles before the bivalents divide, and the two univalents may pass to the same pole (Photo 9) or to opposite poles (Photo 8) at random. About 2 per cent of the univalents were heterobrachial. Apparently most of the univalents are derived from one of the isobrachial chromosomes, although at least three of the five pairs of chromosomes may fail to pair.

The average chiasma frequency at meiosis is 1.5 per bivalent. The chiasma frequency per bivalent is the same whether there are 5, 4, or 3 bivalents. Apparently the chromosome which shows the greatest amount of asynapsis, has the normal chiasma frequency when it is paired.

The prevalence of single chromatid bridges and two univalents in the irregular meiotic figures seems to show that an inversion in only one of the five pairs of chromosomes is involved in most cases. If two chromosomes form chromatid bridges with equal frequency, the single and double bridges should be equally frequent; but very few double bridges were observed. Asynapsis of one pair of chromosomes is twenty times as frequent as simultaneous asynapsis in two pairs of chromosomes. But if most of the fragments are produced by one heterozygous inversion, there should be considerable uniformity in length of fragments.

When a heterozygous inversion is paired homologously (Fig. 2), the length of the fragment will be the same, regardless of the locus of crossing over in the loop. A crossover at either locus 2 or 3 will produce the metaphase bridge and fragment shown in Fig. 6. Two non-compensating crossovers will produce two bridges and two fragments (Fig. 8). A crossover in the loop and a partial compensating crossover proximal to the inversion will

produce a loop and a fragment, as Smith has described in *Trillium*. In all cases, however, the fragment size is the same. A large heterozygous inversion paired homologously can never produce a fragment as long as the normal chromatid arm.

The long fragments will be produced by a short inversion near the fiber attachment (Figs. 9 and 4), and a short fragment is formed by crossing over in the loop formed by a short distal inversion (Figs. 10 and 5). It is possible that most of the longest fragments found in *Paeonia* are produced by crossovers in a short inversion loop in the heterobrachial chromosome. But the evidence seems to show that most of the fragments are derived from one of the four isobrachial chromosomes. How, then, can we account for the variations in fragment length from less than a micron to nine microns?

McClintock (1933) has shown that chromosome pairing is dependent upon homologous attractions and a tendency to associate in twos, regardless of homology. Chromosomes heterozygous for an inversion may pair homologously at all loci and form a loop, or pair non-homologously in the inverted region and form a rod. The longer the inversion, the greater is the amount of homologous pairing. Intermediate conditions are also found, and in the case of deletions the buckle of the normal homologue may be shifted past the deletion in the deficient homologue. If loops can be shifted in a similar manner, the size of the fragment would vary from those as long as, or longer than, a normal arm, to fragments less than a micron in length (Cf. Figs. 9 and 10).

It is known that crossovers may occur in chromosome segments paired non-homologously (Rhoades and McClintock 1935). We have considered the possibility of inverted crossovers in such non-homologous loci as a possible explanation of variation of fragment length. Such crossovers in a long inversion would produce fragments of all sizes with about equal frequency (Fig. 1). This theory would account for the very short fragments, which are difficult to account for if the heterozygous inversion is paired homologously, because a short inversion usually pairs non-homologously. In order to obtain a considerable range in fragment size, a relatively long inversion must be present; but McClintock has shown that the chromosomes of *Zea* which are heterozygous for a long inversion usually pair homologously to form a loop. The evidence from pollen sterility indicates, however, that non-homologous pairing of heterozygous inversions are frequent in *Paeonia*.

The Bussey plant has about 66 per cent poor pollen, as compared with less than 10 per cent pollen sterility of many of the plants in the Arboretum. Asynapsis and random distribution of

univalents would account for about 10 per cent of the pollen sterility, and the deficiencies resulting from fused chromatids would account for about 6 per cent pollen sterility, leaving 50 per cent of pollen sterility to be accounted for. Crossing over in heterozygous inversions paired non-homologously, could produce anaphase figures which appear normal, but two of the four chromatids would carry deficiencies (Figs. 1 and 3). At least three of the five pairs of chromosomes carry heterozygous inversions, and it is possible that other shorter inversions are present which pair non-homologously. In order to account for the pollen sterility which can not be accounted for by visible irregularities, there must be an average of one crossover per cell in heterozygous inversions paired non-homologously. In view of the prevalence of inversions in *Paeonia* species, such a frequency may actually occur in certain plants.

Although there is some evidence to support the suggestions that crossovers in non-homologously paired loops or inverted crossovers in non-homologously paired rods are the cause of variation in fragment size, it is possible that only homologous crossing over is involved in the heterozygous inversions. At least three inversions have been detected, cytologically, in this plant, and it is probable that additional short inversions are present. If these inversions are distributed more or less at random in relation to the fiber attachments in the different chromosomes, the crossovers in the homologously paired heterozygous inversions would produce the variation in fragment size. Such short inversion would be expected to pair non-homologously frequently, and crossovers at such loci would produce the high pollen sterility.

As McClintock has pointed out, the formation of a fused chromatid and fragment in a heterozygous inversion shows that crossing over occurs between only two of the four chromatids, and that the sister chromatids remain attached at the fiber attachment during the first meiotic division. The formation of only one fused chromatid between two homologues and the absence of ring chromatids, show that only single crossovers occur in the chromosome arms heterozygous for inversions. This frequency is in accord with the chiasma frequency, indicating that the crossover frequency and chiasma frequency at metaphase are closely correlated, and that terminalization does not reduce the chiasma frequency in meiotic prophase.

Summary

Fused chromatids and chromatid fragments were found in a plant of *Paeonia suffruticosa* grown at the Bussey Institution. The inversions which produce the chromatid bridges occur in at least

three of the five pairs of chromosomes. Heterozygous inversions also cause partial asynapsis. The irregularities at meiosis cause about 66 per cent of pollen sterility. Most of the sterility is attributed to crossing over in heterozygous inversions paired non-homologously.

The size of the chromatid fragments varies from a fraction of a micron to 9 microns in length. The uniform distribution of fragment size is attributed to crossing over in a number of short heterozygous inversions paired homologously, although there is some evidence that the variation in fragment size is caused by crossing over in non-homologously paired loops, or by inverted crossing over in non-homologously paired rods.

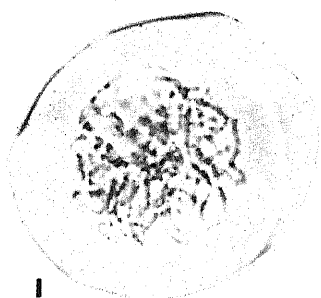
Literature Cited

- Beadle, G. W., and A. H. Sturtevant, 1935. X chromosome inversions and meiosis in *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. 21: 384-390.
- Hicks, G. C., and G. L. Stebbins, 1934. Meiosis in some species and a hybrid of *Paeonia*. Amer. J. Bot. 21: 228-241.
- McClintock, B., 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea Mays*. Zeit. Zellforsch. u. mikr. Anat. 19: 191-237.
- Rhoades, M. M., and B. McClintock, 1935. The cytogenetics of maize. Bot. Rev. 1: 292-325.
- Smith, S. G., 1935. Chromosome fragmentation produced by crossingover in *Trillium erectum* L. J. Genet. 30: 227-232.
- Sturtevant, A. H., and Th. Dobzhansky, 1936. Inversions in the third chromosome of wild races of *Drosophila pseudoobscura*, and their use in the study of the history of the species. Proc. Nat. Acad. Sci. 22: 448-450.

Description of Plate 4

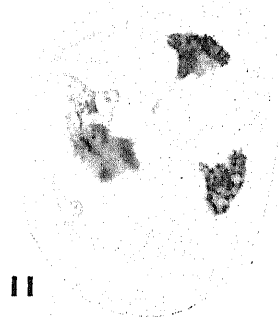
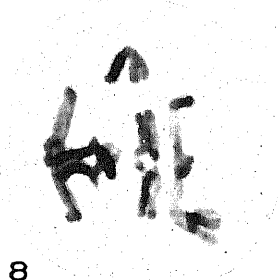
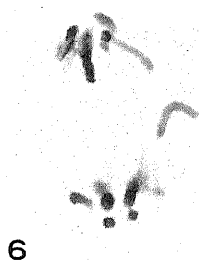
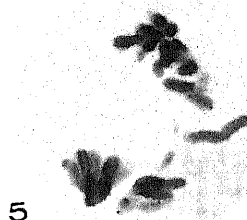
Photographs of meiotic stages in *Paeonia suffruticosa* from aceto-carmines smears. Magnification $\times 1200$.

- Photo 1. Pachytene stage showing paired and unpaired chromatids. The material was not suitable for a study of pairing of heterozygous inversions.
- Photo 2. A normal meiotic metaphase showing chiasma formation in the five bivalents.
- Photos 3-5. Fused chromatids and fragments resulting from crossovers in heterozygous inversions in one of the isobrachial chromosomes.
- Photo 6. A fused chromatid connecting the heterobrachial homologues and a long fragment.
- Photo 7. Late meiotic anaphase showing breaking of the chromatid bridge. The bridges usually persist through the second meiotic division.
- Photos 8 and 9. "Non-disjunction" resulting from partial asynapsis. The univalents pass to the same pole or to opposite poles at random.
- Photo 10. A normal second division.
- Photo 11. A second meiotic division showing the chromatid bridge formed at the first division. In rare cases the bridge at the second division may be formed by a fused ring chromatid formed at the first meiotic division.



2(+E)

2



Sax: Chromosome inversions in *Paeonia suffruticosa*



Eine schematische Darstellung der osmotischen Arbeitsleistung und Zustandsgrößen der Pflanzenzelle

Von

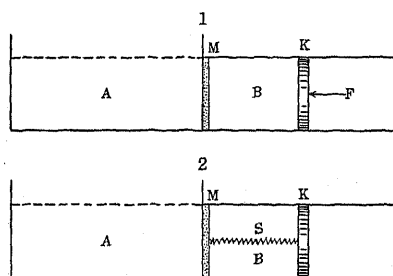
Tetsu Sakamura

Botanisches Institut der Hokkaido Kaiserlichen Universität

Zum Erklärungsversuche der osmotischen Erscheinungen der pflanzlichen Zelle läßt sich oft der Osmometer als analoges Modell benutzen. Es ist aber zweifelhaft, ob die Kenntnis der Beziehung zwischen dem Osmometer und dem dazu gehörigen Manometer bisher immer treffend auf die Erklärung der Zellmechanik angewendet worden ist. Bei einer gewöhnlichen pflanzlichen Zelle ist ihre Membran elastisch dehnbar und begleitet das Ein- und Austreten des Wassers ihre merkliche Volumänderung. In dieser Hinsicht kann eine Zelle mit dem Osmometer vergleichbar sein, wo die Veränderung des Volumens und der Konzentration der Lösung zum gewissen Grade stattfindet. Die Membrandehnung beim Wassereintritt ist eine Arbeit, die durch den osmotischen Druck innerhalb der Zelle geleistet wird, und die Hinaufschubung der Quecksilbersäule im Manometer kann als eine dazu analoge Erscheinung betrachtet werden. Wenn die Dehnbarkeit der Zellmembran durch irgend eine Methode gemessen werden könnte, so würde sie als ein Zeiger des osmotischen Drucks innerhalb der Zelle so gute Dienste leisten wie der Manometer des Osmometers. Solche Annahme ist natürlich insofern gültig, als der für die Membrandehnung notwendige osmotische Druck vernachlässigt werden kann. Dies ist aber tatsächlich nicht der Fall bei der Zelle, weil eine verhältnismäßig große Arbeit geleistet werden muß, um eine Membrandehnung hervorzurufen, welche gleichzeitig merkliche Veränderung der Konzentration und des osmotischen Drucks innerhalb der Zelle begleitet. Um klares Verständnis der osmotischen Erscheinung der pflanzlichen Zelle zu gewinnen, will ich hier mit einigen analogen Modellen eine schematische Darstellung ausführen (Fig. 1 u. 2).

Wasser wird in A ebenso tief gefüllt wie in B, das Volumen von A ist unvergleichlich größer als dasjenige von B und bleibt praktisch fast konstant, wenn auch wenig Wasser von A in B übergeht. Kein hydrostatischer Druck infolge der Niveaudifferenz entsteht daher zwischen A und B. A und B werden mit einer undehnbaren semi-permeablen Wand (M) gegeneinander begrenzt. K ist ein frei beweglicher Kolben, der gegen die Wand von B reibungslos ist.

I. Wenn A und B (Fig. 1) beide gleich mit Wasser oder isotonischen Lösungen gefüllt werden, so entsteht hier ein osmotischer Gleichgewichtszustand, und findet keine Wasserwanderung statt. Wird aber nun A mit Wasser und B mit der Lösung von der Konzentration C_B gefüllt, so entsteht die Osmose: eine Wanderungstendenz des Wassers von A nach B. Wenn die Wasserwanderung,



d.h. die Verschiebung des Kolbens, verhindert werden soll, muß eine Kraft F von außen auf Kolben K wirken. Der Wert dieser Kraft ist gleich demjenigen des hier entstandenen Drucks $C_B RT$ Atm. Der zurückgehaltene osmotische Druck ist fähig, Arbeit zu leisten, so z.B. Wassertreiben, wenn die von außen wirkende Kraft entfernt wird.

Wenn die Lösung B maximal verdünnt wird, wird der osmotische Druck zur Arbeitsleistung ganz ausgenutzt. Wenn aber nur ein Bruchteil der äußeren Kraft weggeschafft wird, hört die oben erwähnte osmotische Arbeit unterwegs auf, und wird der arbeitsfähige osmotische Druck mehr oder weniger stark noch zurückgehalten. Beim festgehaltenen Kolben dauert der entwickelte osmotische Druck unveränderlich, ohne Arbeit zu leisten.

Wird eine Lösung von der Konzentration C_A statt Wasser zur Verwendung gebracht und ist der Wert des entstandenen osmotischen Drucks proportional der Konzentrationsdifferenz der Lösungen A und B, so beträgt er $(C_B - C_A) RT$ Atm. Andere Verhältnisse sind gleich den oben erwähnten.

II. Nun werden die semipermeable Wand und der Kolben K mit einer Schraubenfeder (S) verbunden (Fig. 2). Wird A mit Wasser und B mit einer Lösung von C_B gefüllt, so tritt Wasser von A in B ein, begleitend die Volumzunahme von B und die Kolbenverschiebung, während die Schraubenfeder angespannt wird. Da die Schraubenfeder aber gegen die osmotische Arbeit widerstandsfähig ist, ist ihre Dehnbarkeit beschränkt und hört die Verschiebung des Kolbens dann auf, wenn arbeitsfähiger osmotischer Druck gleich dem Widerstand der Schraubenfeder wird. Die ausgedehnte Schraubenfeder besitzt nun elastische Kraft, den Kolben K links zu ziehen. Gegen diese elastische Kraft wirkt natürlich osmotischer Druck von gleicher Intensität im Raum B, und hier herrscht ein Gleichgewichtszustand.

In Bezug auf die Verschiebung des Kolbens, welche durch den osmotischen Druck geleistet wird, kann man folgende vier Fälle aufzählen:

1. Der Kolben ist frei beweglich. Die Arbeit wird ohne Hindernis geleistet, bis der osmotische Druck ausgenutzt wird, nämlich bis die Lösung in B maximal verdünnt wird.

2. Gegen die Verschiebung des Kolbens wirkt eine Außenkraft, deren Intensität gleich derjenigen des osmotischen Drucks oder noch stärker ist. Im extremen Fall ist der Kolben unbeweglich festgesetzt. Wie hoch der osmotische Druck in B sein mag, findet im letzten Falle keine Volumvergrößerung statt, und wird keine osmotische Arbeit geleistet.

3. Gegen die Verschiebung des Kolbens wirkt eine Außenkraft, die schwächer als der osmotische Druck ist. Der Kolben kann bis zur gewissen Strecke sich bewegen, aber die Bewegung ist durch eine Außenkraft beschränkt. Das Volumen von B wird bis zum gewissen Grade vergrößert, und ein Bruchteil des osmotischen Drucks bleibt als solcher zurück.

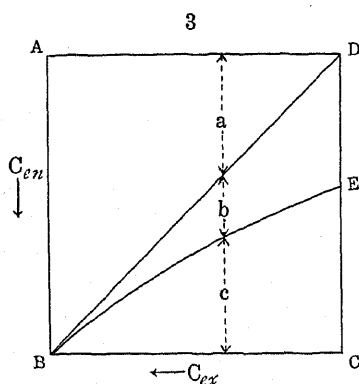
4. Die Bewegung des Kolbens ist durch eigene Eigenschaft, z.B. durch die mit Schraubenfeder ausgerüstete Vorrichtung, beschränkt. Einerseits geschieht eine Volumvergrößerung in B, andererseits wird eine Arbeit geleistet, die Schraubenfeder auszuziehen.¹⁾ Der osmotische Druck wird teils ausgenutzt, und herrscht teils als ein Gegendruck jetzt in B, der mit der elastischen Kraft der Schraubenfeder im Gleichgewichtszustand steht.

Der mit der Schraubenfeder versehene Modellosmometer II kann als analog zur pflanzlichen Zelle vorgezogen werden, indem die Dehnbarkeit der Schraubenfeder mit derjenigen der Zellmembran vergleichbar ist. Diesen analogen Fall in Betracht ziehend, wenden wir uns jetzt dem Erklärungsversuch der osmotischen Zustände der Zelle zu. Um die Erklärung leicht verständlich zu machen, wurde eine graphische Darstellung versucht, welche die Beziehung zwischen der Konzentration der Außenlösung und den osmotischen Zustandsgrößen der Zelle klar illustriert. Da der osmotische Druck der Konzentration der Lösung proportional ist, soll hier nur der letztere Ausdruck anstatt des ersteren verwendet werden. Die Konzentration der gesamten osmotisch wirksamen Substanzen in dem Zellinneren wird „osmotische Konzentration“²⁾ genannt, deren Bruchteil bald an der Entwicklung des aktiven osmotischen Druckes sich beteiligt, bald durch die Außenlösung osmotisch äquilibriert wird. Die osmotische Konzentration bleibt daher konstant in einer Zelle, soweit die gesamte Menge der gelösten Stoffe unveränderlich ist.

1) Diese sogenannte Arbeit ist nicht anders als die Bestrebung des osmotischen Drucks mit dem Widerstand der Schraubenfeder im Gleichgewicht zu stehen.

2) Dieser Ausdruck bedeutet etwas anderes als derjenige von PRINGSHEIM (1931).

Wir nehmen die Konzentration der Außenlösung C_{ex} auf die Abszisse und die osmotische Konzentration des Zellsaftes C_{en} auf die Ordinate (Fig. 3). Am Punkt C ist die Außenflüssigkeit Wasser,



und nach der Pfeilrichtung hin steigt die Konzentration. Bei B sind die Konzentrationen des Zellsaftes und der Außenlösung gleich, und dabei wird die Zellmembran von beiden Seiten durch keinen Druck beeinflusst, d.h. kein osmotischer Druck herrscht an der Zelle. Dieser osmotische Zustand ist gewöhnlich bei der Grenzplasmolyse vorstellbar, und die Konzentration bei B lässt sich mit C_i bezeichnen. Da $AB = BC$ ist, so ist das Viereck ABCD ein Quadrat. Die schräge

Linie BD neigt sich sowohl zur Abszisse als zur Ordinate mit Winkel 45° , somit bedeutet sie die Isotonie der Außen- und Innenlösung. Die Linie BE kann entweder eine Gerade oder eine Kurve sein, was von der Dehnbarkeit der Zellmembran abhängig ist. Die Konzentration, welche mit der Strecke zwischen AD und BE ausgedrückt wird, so z.B. $a + b$, ist diejenige des Zellsaftes. Die Strecke zwischen BC und BE, so z.B. c , bedeutet die Konzentration des Zellsaftes, die infolge des Wassereintritts ausgeglichen wird, wenn die Zelle aus der isotonischen Außenlösung in eine bestimmte hypotonische Lösung übergeführt wird. Der Wert einer Senkrechten innerhalb $\triangle ABD$, so z.B. a , zeigt den Bruchteil der inneren Konzentration, der stets durch die Außenlösung äquilibriert wird; sie ist daher gleich der letzteren. Wenn die Zellmembran zwangslos ausgedehnt werden könnte, wie der frei bewegliche Kolben des analogen Modells, würden die Bruchteile des entwickelten osmotischen Drucks meistens zur Arbeitsleistung des Wassertreibens benutzt, und würden die Linien BD und BE zusammenfallen. Bei der pflanzlichen Zelle ist dies aber tatsächlich nicht der Fall. Die Membranausdehnung ist mehr oder weniger stark beschränkt; analog zum Modell, welches mit Schraubenfeder versehen ist. Im Gleichgewichtszustand ist die Konzentration des Zellsaftes immer höher als diejenige der Außenlösung, nur mit Ausnahme der plasmolysierten Zellen. Ein Bruchteil der osmotischen Konzentration nimmt an der Entwicklung des aktiven osmotischen Drucks teil, der an einer pflanzlichen Zelle gewöhnlich zweierlei Dienste leistet. 1. Die ausgedehnte Membran erwirkt die nach innen wirkende elastische Kraft d.h. den „Wanddruck“, während innerhalb der

Zelle demgegenüber der osmotische Druck d.h. der „Turgordruck“ steht. Beide Druckarten sind gleichwertig und stehen miteinander im Gleichgewichtszustand. Sie entsprechen der Konzentration zwischen den Linien BD und BE nämlich $C_{en}-C_{ex}$, so z.B. b. Der Turgordruck kommt erst infolge der Membranausdehnung vor, aber er ist nicht mehr fähig, weitere Arbeit zu leisten, soweit die Dehnbarkeit der Membran unveränderlich bleibt. 2. Andererseits dient der osmotische Druck auch zum Wassertreiben, das die osmotische Arbeit im eigentlichen Sinne ist. Wenn der Druck in der Konzentration relativ ausgedrückt wird, beträgt er diejenige zwischen den Linien BE und BC, so z.B. c. Auch dieser Bruchteil des osmotischen Drucks ist in arbeitsunfähigen Zustand übergegangen. Die Summe dieser Bruchteile $b + c$, welche schon Arbeit geleistet haben, entspricht dem gesamten osmotischen Druck, der augenblicklich auftritt, wenn die Zelle aus der isotonischen Lösung in die Lösung von C_{ex} übergeführt wird. Wenn die Zellmembran stark straff ist und keine Dehnbarkeit hat, so bemerkt man keine Volumzunahme, und wird der der Konzentration $b + c$ entsprechende osmotische Druck unveränderlich erhalten. Wird solche Zelle ins Wasser übergeführt, entwickelt sich osmotischer Druck C_iRT Atm., ohne spätere Veränderung auszuführen, ein analoger Fall zu dem mit festgesetztem unbeweglichen Kolben versehenen Modell 2. Auch falls die Volumzunahme einer Zelle trotz ihrer genügend hohen Dehnbarkeit durch den gegenseitigen Druck der benachbarten Zellen verhindert wird, entsteht der Turgordruck dadurch.

Die osmotische Konzentration zwischen BE und BC, so z.B. c, ist gleich dem Wert C_i-C_{en} . Wird die mit der dehnbaren Membran versehene Zelle ins Wasser übergeführt, wo $a = 0$ ist, erreichen c und b die maximalen Werte EC bzw. ED. Eine Zelle ist jetzt wassergesättigt und nicht mehr fähig, Wasser einzusaugen. Die Konzentration in diesem extremen Zustand ist der einer bestimmten Zelle eigentümliche Wert und bedeutet die Grenze der Dehnbarkeit der Membran und gleichzeitig den Widerstand, der durch die Zellmembran gegen den inneren osmotischen Druck stets beibehalten wird.

Bevor auf weitere Besprechung der osmotischen Erscheinungen eingegangen wird, sei die Rede von der Nomenklatur. PFEFFER hat den Turgordruck und den osmotischen Druck der pflanzlichen Zelle gleichsinnig behandelt und den ersteren als den auf der Wand lastenden ganzen Innendruck aufgefaßt. Um Mißverständnisse zu vermeiden, haben aber URSPRUNG und BLUM (1920) und URSPRUNG (1930) vorgeschlagen, den vieldeutigen Ausdruck „osmotischer Druck“ aus der Bezeichnung der osmotischen Zustandsgrößen aus-

zuschalten und für diesen Zweck folgende zweckmäßigen Ausdrücke zu verwenden:¹⁾

1. Saugkraft der Zelle.
2. Saugkraft des Zellinhaltes.
3. Wanddruck.
4. Turgordruck.

Die meisten Autoren sind heute darin einig, diese Ausdrücke im Sinne von URSPRUNG aufzufassen. Bevor wir weiter unten die osmotischen Zustandsgrößen unter Verwendung einer von mir ausgedachten schematischen Darstellung zu erklären versuchen werden, will ich über die Brauchbarkeit des Ausdrucks „osmotischer Druck“ eine kurze Bemerkung machen. Obwohl URSPRUNG auf die Vieldeutigkeit dieses Ausdrucks hingewiesen und vorgeschlagen hat, sie aus der Bezeichnung der osmotischen Zustandsgrößen auszuschalten, so scheint sie bei dem Erklärungsversuche der osmotischen Arbeitsleistung der pflanzlichen Zelle in der physikalisch-chemischen Auffassung noch beibehalten zu werden. Der osmotische Druck in der pflanzlichen Zelle ist ein tatsächlich existierender Druck, der noch Arbeit leisten und bald ausgeglichen werden kann. Der Turgordruck ist der in der Zelle existierende Innendruck, der erst zu bemerken, wenn ein Gleichgewichtszustand zwischen der Außen- und Innenlösung erreicht wird. Dieser ist daher der osmotischen Druck im Gleichgewicht mit dem Wanddruck. In einer Zelle, die nicht mehr im Gleichgewichtszustand sich befindet, geht der Turgordruck oder dessen Bruchteil in den arbeitsleistende osmotischen Druck über, wenn die Dehnbarkeit der Zellmembran erhöht wird. Die Arbeit der Zelle, aus einer hypotonischen Lösung Wasser einzunehmen, begleitend die Ausdehnung der Zellmembran, wird nicht durch den Turgordruck geleistet, sondern durch den neu auftretenden osmotischen Druck. Der Turgordruck tritt stets als der schon ausgeglichene osmotische Druck auf.

Die Saugkraft der Zelle nach der Definition von URSPRUNG und BLUM (1920) ist eine Kraft, mit der die Zelle Wasser zu saugen strebt, und wird mit der heute gut bekannten Formel

$$S_z = S_i - W$$

ausgedrückt, wo S_z die Saugkraft der Zelle, S_i die Saugkraft des Zellinhaltes und W den Wanddruck bedeutet. Wir möchten die Saugkraft der Zelle auch hier schematisch darstellen. Die Saugkraft des Zellinhaltes wird durch eine Gleichung

$$S_i = (a + b)RT$$

1) Auch HÖPLER (1920).

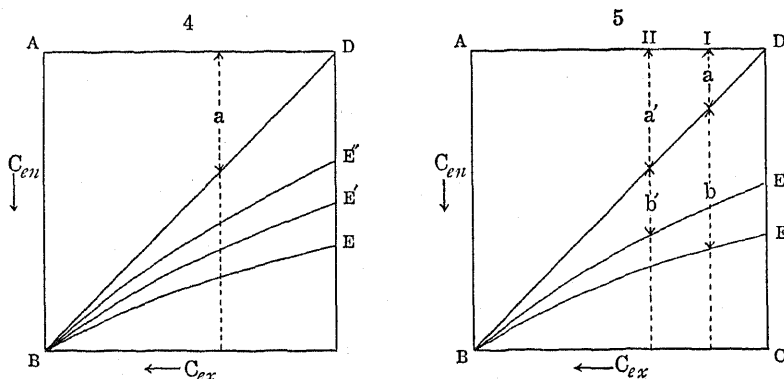
dargestellt, wo S_i gleich dem osmotischen Wert des Zellsaftes ist, dessen Konzentration $a + b$ beträgt. Der Wanddruck W ist gleichwertig mit dem Turgordruck, der in diesem Falle mit b bezeichnet werden kann, also

$$W = bRT.$$

Setzen wir diese Werte in die Saugkraftformel ein, so läßt sich erhalten

$$\begin{aligned} S_z &= (a + b - b)RT \\ &= aRT. \end{aligned}$$

Die der Saugkraft der Zelle entsprechende osmotische Konzentration ist also gleich derjenigen der Außenlösung, wenn der osmotische Gleichgewichtszustand zwischen der Außen- und Innenlösung erreicht wird. Es ist jetzt begreiflich, daß dies das Prinzip für die „Gleichgewichtsmethode“ nach URSPRUNG bei der Bestimmung der Saugkraft der Zelle bildet, in der als die Saugkraft der osmotische Wert der Außenlösung ermittelt wird, wobei Wasser von der Zelle weder aufgenommen noch abgegeben wird. URSPRUNG hat die Saugkraft in Atmosphären ausgedrückt, aber hier soll Bequemlichkeit halber ihr relativer Wert in der Konzentration gezeigt werden; so ist z.B. die Saugkraft der Zelle gleich a . Wenn eine Zelle, deren Saft durch eine Außenlösung von bestimmter Konzentration äquilibriert ist, ins Wasser gebracht wird, so können wir einen in diesem Augenblick entstandenen osmotischen Druck uns vorstellen, der noch solche Arbeit wie die Membrandehnung oder die Wassertreibung leisten kann. Dieser Druck ist analog zum elektrischen Potential und wird als der Intensitätsfaktor der Wassersaugung betrachtet. Je leichter dehnbar die Zellmembran ist, desto stärker geschieht die Saugung. Wenn ihr Widerstand groß ist, wird der osmotische Druck zum großen Teile zum Gleichgewicht mit dem Wanddruck benutzt, und nur wenig Wasser wird von der Zelle eingenommen. Aus dem oben erwähnten geht hervor, daß die „Saugkraft der Zelle“ die Neigung oder Richtung des Wassertransports bedeutet, aber nicht den Saugeffekt oder die gesaugte Wassermenge. Damit eine Arbeit durch die Volumänderung in einem pflanzlichen Gewebe geleistet wird, so z.B. bei der Turgorbewegung, muß auch die gesaugte Wassermenge berücksichtigt werden. Nehmen wir drei Nachbarzellen (Fig. 4) an, deren Saugeffekte vergleichungsweise je mit der Kurve BE , BE' bzw. BE'' bezeichnet werden können, so sind ihre Saugkräfte in dem osmotischen Gleichgewichtszustande alle gleich a . Der Bequemlichkeit halber werden in dieser schematischen Darstellung die plasmolytischen Grenzkonzentrationen dieser Zellen als gleichwertig angenommen. Dieselbe Erklärung behält natürlich auch bei sonstigen Fällen



ihre Geltung. Der maximale Turgordruck, DE, DE', DE'' usw., der sich entwickelt, wenn eine Zelle in Wasser gelegt wird, ist ein konstanter Wert bei einer bestimmten Zelle.

Der Saugeffekt E läßt sich theoretisch mit folgender Formel berechnen:

$$E = C_{en} - C_w,$$

wo C_{en} die innere Konzentration der Zelle in einer Außenlösung von bestimmter Konzentration und C_w diejenige in der Wassersättigung ist. Im letzteren Fall

$$C_{en} = C_w, \quad E = 0, \quad S_z = 0$$

und entspricht C_w dem Wanddruck. In der Praxis dürfte es nicht schwierig sein, die Werte von C_{en} und C_w kryoskopisch oder plasmometrisch zu bestimmen.

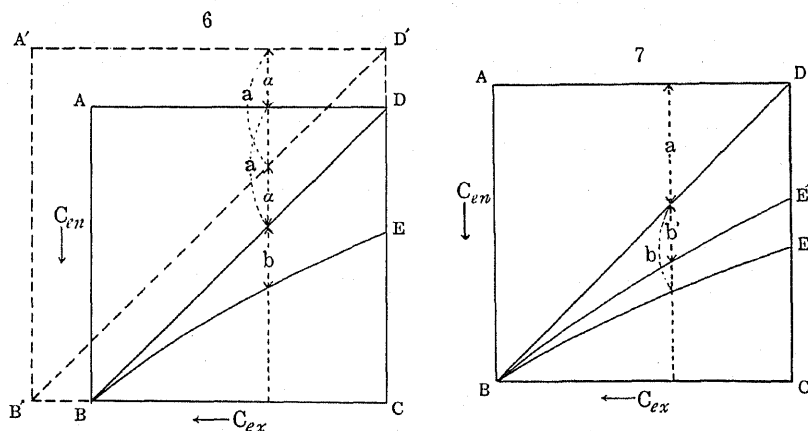
Das Verhältnis E/S_z bedeutet den Bruchteil der Saugkraft, der zur Saugarbeit wirklich dienen kann, und der Wert $1 - E/S_z$ denjenigen, der durch den Wandwiderstand zurückgehalten wird. Der letztere Wert bedeutet auch den relativen Widerstand der Membran.

Nehmen wir nun zwei Nachbarzellen I und II (Fig. 5) an, die sich in verschiedenen osmotischen Medien befinden und zwischen denen kein osmotischer Gleichgewichtszustand erreicht wird. Diese Zellen besitzen selbstverständlich ungleiche Saugkräfte a und a' und ungleiche Turgordrucke b bzw. b' . Zwischen diesen Zellen entstehen folgende Beziehungen:

Osmotischer Wert des Zellsaftes	$a + b > a' + b'$
Wanddruck	$b > b'$
Saugkraft der Zelle	$a < a'$

Der osmotische Wert des Zellsaftes ist größer bei I als bei II, aber ein umgekehrtes Verhältnis besteht betreffs der Saugkraft der Zelle, was von der Dehnbarkeit der Zellmembran abhängig ist.

Nun wollen wir die Veränderung der Saugkraft einer bestimmten Zelle in Betracht ziehen. Diese ist hauptsächlich auf die Mengenveränderung der osmotisch wirksamen Substanzen zurückzuführen. Wenn die Menge der wasserlöslichen Substanzen in dem Zellsaft sich aufs neue um α (Fig. 6) vermehrt und solche Zelle dauernd im bisherigen Medium verweilt, so läßt sich dieselbe Saugkraft a sobald wiedererlangen, als der Gleichgewichtszustand auftritt. Nur solange dieser nicht auftritt, kann die temporär veränderte Saugkraft dauern. Diese Beziehung wird mit einem neuen Quadrat A'B'CD verständlich gemacht. Bevor der Gleichgewichtszustand zutage kommt, erhöht sich also die Saugkraft der Zelle für kurze Zeit zum Wert $a + \alpha$.



Wenn die Dehnbarkeit der Zellmembran sich erhöht, wird die Membran aufs neue ausgedehnt und saugt die Zelle soviel Wasser wie möglich. Die Kurve BE geht zu BE' über, und der Saugeffekt vermehrt sich um EE' (Fig. 7). Der Bruchteil b' des wieder auftretenden osmotischen Drucks b dient zur Membranausdehnung und der Bruchteil b - b' zur Wassersaugung. Da aber die Saugkraft des Zellsaftes sowie der Wanddruck durch diese neue Wassersaugung sich gleichwertig um b - b' vermindern und der totale Wanddruck bzw. Turgordruck erst im Gleichgewichtszustande erscheint, bleibt der Wert $S_z - W$ in der Formel der Saugkraft unveränderlich. Aus diesem Verhältnisse geht hervor, daß die Veränderung der Membrandehnbarkeit den Saugeffekt, aber nicht die Saugkraft der Zelle beeinflusst¹⁾.

1) Nachträglicher Zusatz: Auf der zwölften Generalversammlung der Japanischen Gesellschaft für Förderung der Naturwissenschaft in Okayama, Oktober 1936, ist von mir eine andere Ansicht bezüglich dieser und anderer Frage mitgeteilt worden. Sie hat sich als irrig herausgestellt und ist so, wie hier geschildert, zu berichtigen.

Zusammenfassung

1. Um das Verständnis des osmotischen Zellmechanismus zu erleichtern, wurden analoge Erscheinungen unter Verwendung der schematischen Modelle erklärt, mit besonderer Berücksichtigung der Arbeitsleistung.

2. Die osmotischen Erscheinungen und Zustandsgrößen der pflanzlichen Zelle wurden übersichtlich graphisch dargestellt. Der Zusammenhang der Konzentration der Außenlösung mit der Saugkraft der Zelle, der Dehnbarkeit der Zellmembran usw. wurde dadurch leicht begreiflich gemacht.

3. Der Ausdruck „osmotischer Druck“ ist noch immer als notwendig zu behalten, um die osmotische Zellmechanik zu erklären.

4. Es wird der Begriff „Saugeffekt“ der Zelle vorgeschlagen, die Zellerscheinung zu verstehen, durch welche ihre Volumänderung erfolgt.

Literaturverzeichnis

Höfler, K. (1920): Ein Schema für die osmotische Leistung der Pflanzenzelle. Ber. d. d. Bot. Ges., 38.

Pringsheim, E. G. (1931): Untersuchungen über Turgordehnung und Membranbeschaffenheit. Jahrb. f. wiss. Bot., 74.

Ursprung, A. (1930): Zur Terminologie und Analyse der osmotischen Zustandsgrößen. Zeitschr. f. Bot., 23.

— und Blum, G. (1920): Dürfen wir die Ausdrücke osmotischer Druck, Turgordruck, Saugkraft synonym gebrauchen? Biol. Centralbl., 40.

The Inert Chromosomes of *Drosophila ananassae* Doleschall

By

Hideo Kikkawa

Zoological Institute, Kyoto Imperial University

In the oogonial metaphase of *Drosophila ananassae* synonymous to *D. caribbea* of STURTEVANT, as shown in my previous paper (KIKKAWA 1936), four pairs of chromosome association are formed, consisting of three larger and one smaller, all being in V-shape. In the spermatogonial metaphase, one of large V-shaped chromosomes is replaced with a small J-shaped one. Therefore, this association can be regarded as representing sex-chromosomes, i.e., X and Y.

Judging from the type of chromosome association above mentioned, this species should have four large linkage groups. But, so far only three of them have been found: X = 28 (including multiple alleles), II = 19, III = 12. This fact suggests strongly that one of autosomal pairs is inert. My recent cytological observations have proved the fact clearly.

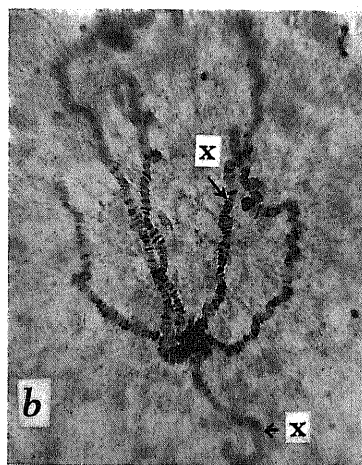


Fig. 1. a. Oogonial metaphase of haplo-IV female. b. Female salivary gland chromosomes.

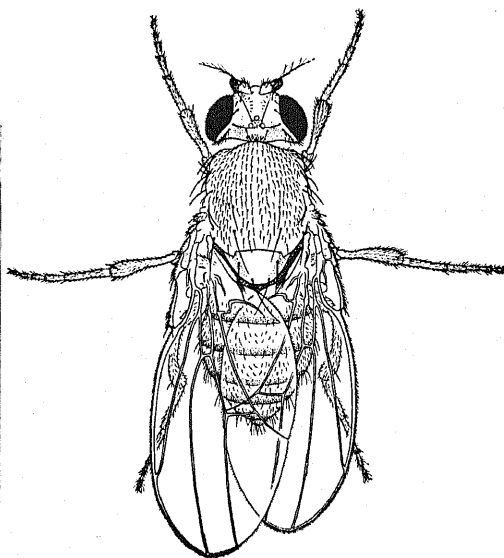


Fig. 2. Mosaic female. Left: Diplo-IV. Right: Haplo-IV.

In the nucleus of a salivary gland cell, there are found eight strands of chromosomes, of which two are very small and embedded in the chromocenter (Fig. 1, b). As PAINTER and STONE (1935) have mentioned, two strands of a V-shaped chromosome are generally connected at the locus of spindle-fiber attachment, even when they are dissociated under pressure from the chromocenter. From these cytological findings, the small strands within the chromocenter represent one pair of chromosomes. Since PAINTER and others pointed out that the inert or the inert region of chromosome is scarcely visible in the salivary gland cell, the pair of chromosome in question is assumed as representing it. Furthermore, there is an evidence that the pair belongs to one of autosomes; the X-chromosomes in the male are easily distinguished from the autosomes in a salivary gland cell.

But, it still remains us to be replied which pair of autosomes is inert. In order to give a proper answer to this question, several attempts have been performed till we at last come to find out flies which correspond to haplo-IV or Diminished of *D. melanogaster* (Fig. 2). Cytological examination of them has disclosed that one of small V-shaped chromosomes (the fourth chromosome) is missing (Fig. 1, a). Hence, there is almost no doubt that the small V-shaped chromosomes are virtually inert.

In connection with this conclusion, it may be supposed that the distal part of one arm of this inert chromosome is homologous to the short arm of the Y-chromosome. Evidences for this hypothesis are given in the following experiments: (1) If haplo-IV males are mated to normal females, the number of haplo-IV males which appear

Table 1. + ♀ × Haplo-IV ♂

Normals		Haplo-IV		Total
♀ ♀	♂ ♂	♀ ♀	♂ ♂	
867	381	228	487	1963

in the offspring, is greater than that of haplo-IV females whereas the number of normal males is only about a half of the corresponding females (Table 1).

This unexpected result may, however, be easily accounted for by the assumption that the Y-chromosome occasionally synapses with the free fourth chromosome. The schema illustrating this relation is given in Figure 3.

The frequencies of appearance of the offspring which results from the combination of one of these sperms with a normal egg are:

Normal females,	$(2x + y)/4$
Normal males,	$y/4$
Haplo-IV females,	$y/4$
Haplo-IV males,	$(2x + y)/4$

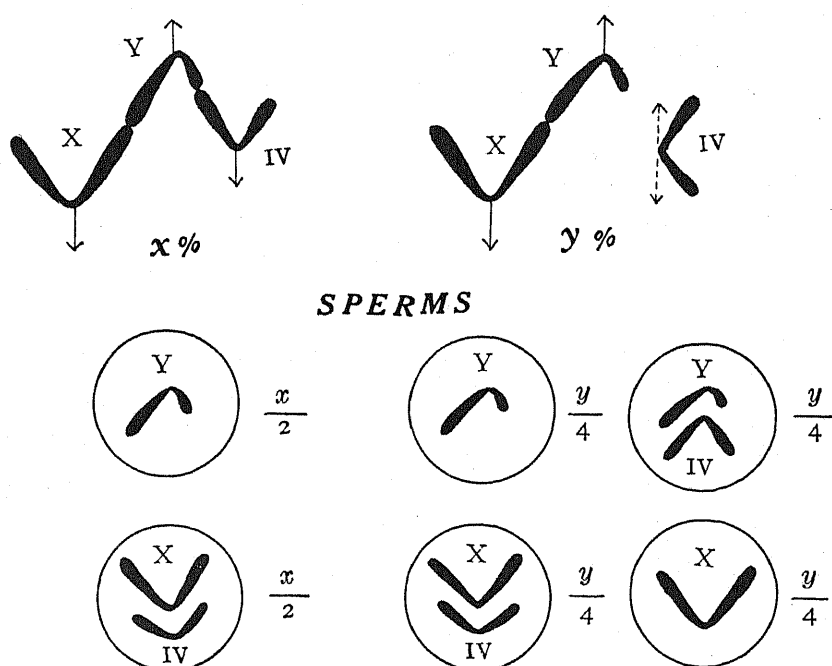


Fig. 3. Figure illustrating the relation between sex and fourth chromosomes.

The values x and y calculated from the experimental results are: $x = \text{ca. } 38\%$, $y = \text{ca. } 62\%$ respectively. The discrepancy found between theoretical and experimental results is apparently due to low viability of haplo-IV individuals.

(2) If XXY females are mated to normal males, there appear in the offspring many haplo-IV individuals (Table 2).

This unexpected result is also accounted for by the assumption that the free Y-chromosome in XXY female often synapses with one of

the fourth chromosomes. In facts, the Y-chromosome generally comes near the fourth chromosome in the oögonial metaphase of XXY or of XXY haplo-IV female, and even in the spermatogonial metaphase of normal male. These cytological studies suggest that the short arm of the Y-chromosome is homologous to the distal part of an arm of the fourth chromosome.

Recently, KAUFMANN (1936) observed an interesting phenomenon concerning this problem. According to him, the small autosomes are attached to the nucleolus during early prophase of the division of ganglion cells, and in the male the Y-chromosome forms the

Table 2. XXY ♀ × XY ♂

Normals		Haplo-IV		Total
♀ ♀	♂ ♂	♀ ♀	♂ ♂	
585	522	147	123	1377

third member of such a group. This fact further adds an evidence from the cytological view-point.

Further details on this problem are preserved for a future occasion. At present, the indication of the presence of an inert chromosome like Y-chromosome or androsomes of *Sciara* in *Drosophila* as well as that of the existence of homologous parts between sex and somatic chromosomes, promise a profitable development as to the relation between genes and chromosomes.

In conclusion, I wish to express my hearty thanks to Professor TAKU KOMAI for his valuable advice and criticism, and also to Hattori Hôkôkwai for its financial aid.

Literature cited

- Kaufmann, B. P., 1936. The chromosomes of *Drosophila ananassae*. *Science* 83: 39.
Kikkawa, H., 1936. Chromosomes of *Drosophila ananassae* (a preliminary note).
Jap. Journ. Genet. 12: 65-66.
Painter, T. S., and W. Stone, 1935. Chromosome fusion and speciation in *Drosophila*.
Genetics 20: 327-341.
-

Ein Beitrag zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Protoplasmas

Von

Hugo Kaho

Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des botanischen
Instituts der Universität Tartu, Estland

LUNDEGÅRDH (1911) hat in den grundlegenden Versuchen bei den Wurzeln von *Vicia Faba* mit der Gewebespannungsmethode gezeigt, daß Neutralsalze die Wasserpermeabilität der Zellen stark beeinflussen können, wobei die Salze additiv wirkten. Kationen und Anionen der untersuchten Salze förderten die Wasserosmose nach den Reihenfolgen:

(Chloride) $Mg > Na > Li > K > NH_4$

$Cl > Zitrat > HPO_4 > SO > NO_3 > J > Azetat$

DE HAAN (1933) fand mit der plasmolytischen Methode bei Epidermiszellen der Zwiebelschuppen von *Allium Cepa*, daß die untersuchten Plasmolytika (Rohrzucker + Salz) die Deplasmolyse förderten wie folgt:

Nitrate $Li > Na > K > Mg > Ca > Al$

K-Salze $CNS > NO_3 > SO_4$

Da die Ionenreihen beider Forscher wenig übereinstimmen, so wurden Versuche angestellt um zu untersuchen 1. welcher Zusammenhang zwischen der Aufnahme der Salze in die Zelle, und der Beeinflussung der Wasserpermeabilität durch sie besteht, und ferner noch 2. welchen Einfluß Salzgemische auf die Wasserpermeabilität ausüben.

Methodisches

Die Versuche wurden mit Staubfädenhaaren von *Tradescantia virginica*, die in unserem botanischen Garten kultiviert wird, im Juli und August angestellt. Es wurden Deplasmolysezeiten mit isotonischen Salzlösungen plasmolysierter Zellen untereinander verglichen. Bekanntlich bestehen die Staubfädenhaare aus einer Reihe Zellen, deren Größe nach der Spitze allmählich abnimmt. Die Basalzellen (ältere) haben eine dünnere Plasmaschicht und größere Vakuolen, die Dicke des Plasmabelages wächst in der Richtung zu den jüngeren Spitzenzellen an. Infolge der verschiedenen Plasmadicke und Vakuolengröße ist die Plasmolyse in den zu untersuchenden Lösungen (isotonisch 0,3 mol KNO_3) stärker bei den Basalzellen und nimmt ab nach der Haarspitze zu. Bei den mit Plasma gefüllten Spitzenzellen fehlt sie bei dieser Konzentration in der Regel

gänzlich. In Anbetracht des Gesagten, wurde bei den Versuchen ausschließlich die Reihe der mittleren Zellen beobachtet, die ungefähr die Hälfte der Haarlänge betrug. Die Basal- und Spitzenzellen kamen nicht in Betracht. Die Haarzellen plasmolysierten sich ziemlich schnell, die Plasmolyseform war in der Mehrheit der Fälle eine konkave, seltener bewirkten die Salze eine Krampfplasmolyse. Wenn die Plasmolyse sich nicht mehr vergrößerte (Beginn des plasmolytischen Gleichgewichtes, nach ca. 5-7 Min.), wurde der Staubfaden in Leitungswasser übertragen und die Deplasmolysezeiten der Haarzellen bestimmt. Die jüngeren Zellen, die eine kleinere Plasmolyse hatten, deplasmolysierten sich in der Regel schneller, als die älteren. Es wurden gleichzeitig mehrere Haare desselben Staubfadens beobachtet und sehr oft deplasmolysierten sich mehrere Zellen fast gleichzeitig. Infolgedessen war das gleichzeitige Beobachten und Notieren der Deplasmolysezeiten einer Person schwierig und bei den Versuchen zeichnete eine zweite Person mit der Stoppuhr die Zeiten auf.

Fehlerquellen

Beim Vergleich der Deplasmolysezeiten der Haarzellen verschiedener Blüten, ergab sich, daß größere Abweichungen bei solchen Zellen vorkamen, die einen etwas blasseren Anthozyanton hatten. Diese Blüten waren in der Regel etwas kleiner; größere Blüten hatten einen tief bläulich-violetten Ton und deplasmolysierten sich gleichmäßiger. Es wurde nur mit den letzteren gearbeitet. Bei sorgfältiger Materialauswahl (Blüten von demselben Zweig, gleicher Anthozyanton, gleiches Alter etc.) betrug der Versuchsfehler (= Differenz der Mittelwerte der Deplasmolysezeiten) bei schneller Deplasmolyse ca. 30-40 Sekunden, bei langsamer Deplasmolyse ca. 1 bis 1,5 Minuten.

Es ist bekannt, daß eine schnell ausgeführte starke Plasmolyse und besonders die nachfolgende Deplasmolyse in Wasser, für das Plasma schädlich sein kann. Um diese Schädlichkeit gewissermaßen zu eliminieren, hat man in der letzten Zeit die Plasmolyse und Deplasmolyse stufenweise ausgeführt. Die Gewebestücke werden in verschiedene Plasmolytika mit zunehmender Konzentration (bei Deplasmolyse umgekehrt) gebracht, um größere Konzentrationsdifferenzen zwischen dem Zellsaft und der äußeren Lösung zu vermeiden. Auf diese Weise wird zweifelsohne die schädliche Wirkung der Plasmolyse (resp. Deplasmolyse) herabgesetzt. Meine diesbezüglichen Erfahrungen zeigen, daß im allgemeinen die Zellen mit einem dünnen Plasmabelag leichter geschädigt werden, als die mit einem dickeren. Die Staubfadenhaarzellen haben eine sehr dicke Plasmaschicht und vertragen, deswegen Plasmolyse mit Lösungen, isotonisch 0,3 mol KNO_3 , und nachherige Deplasmolyse sehr gut. Die Plasmolyse dauerte auch nur kurze

Zeit (bis 7 Min.), zur Deplasmolyse wurde Leitungswasser benutzt. Eine nochmalige Plasmolyse, die immer zur Kontrolle nach der Beendigung der Versuche mit 0,4 mol CaCl_2 vorgenommen wurde, zeigte keine Schädigungen der Zellen. Infolgedessen wurde von einer Stufenplasmolyse (resp. —Deplasmolyse) abgesehen, da sie gegebenenfalls keine Vorzüge geboten hätte.

Es wurde mit reinen Salzlösungen experimentiert, da das Objekt dazu geeignet ist. Salzgemische mit Zucker würden wohl, auf Kosten einer höheren Zuckerkonzentration, Versuche mit niederen Salzkonzentrationen ermöglichen. Doch halte ich Mono- und Disaccharide für nicht ganz indifferente Plasmolytika. Sie setzen, wie es mir scheint, die Permeabilität des Plasmas herab. In Gemischen treten die Gesetzmäßigkeiten der Salzwirkungen nicht so deutlich hervor.

Die Vorversuche zeigten, daß Haarzellen, wenn sie am Vormittag von der Sonne beschienen waren, am Nachmittag eine bessere Permeabilität hatten, als an trüben oder regnerischen Tagen. Aus diesem Grunde wurde nur an sonnigen Tagen gearbeitet.

Die Temperatur im Laboratorium schwankte während der Versuche zwischen 20 und 22.

Versuche

A. Alkalisalze

I. Kaliumsalze

1. Beispiel. Ein Staubfadenhaar in 0,3 mol KCNS plasmolysiert. Plasmolysezeit (= Pl.-z.)—5 Min., Plasmolyseform (= Pl.-f.)—konkave, Deplasmolysezeiten in Minuten und Sekunden: 1' 00''; 1' 14''; 1' 37''; 1' 57''; 2' 05''; 2' 18''; 2' 25''; 2' 38''; 2' 48''; 3' 01''; 3' 06''; 3' 14''; 3' 19''; 3' 27''. Mittlere Deplasmolysezeit (= M. Depl.-z.)—2' 22''.

Alle unten angeführten Deplasmolysezeiten sind Mittelwerte aus 12–15 Einzelbeobachtungen. Alle Salze isotonisch 0,3 mol KNO_3 .

2. KJ. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—2' 36''.
3. K_2SO_4 . Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.¹⁾; M. Depl.-z.—6' 42''.
4. KBr. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—3' 14''.
5. K-Azetat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—3' 34''.
6. K-Tartrat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—8' 00''.
7. KNO_3 . Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—4' 39''.
8. KCl. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—4' 33''.
9. K-Zitrat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—6' 44''.

Die untersuchten Kaliumsalze können wir nach ihrer Fähigkeit die Permeabilität des Plasmas für Wasser zu erhöhen in folgende Gruppen einteilen.

(CNS, J)²⁾ > (Br, Azetat) > (Cl, NO_3) > (SO_4 , Zitrat) > Tartrat.

1) „krampf“ bedeutet krampfplasmolytische Plasmolyseform.

2) Durch Kommata sind in den Reihenfolgen diejenige Ionen getrennt, bei welchen die Wirkungsunterschiede in den Grenzen des Versuchsfehlers liegen.

II. Natriumsalze

10. NaCNS. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—1'53''.
11. NaBr. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—2'24''.
12. Na-Azetat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—4'58''.
13. Na-Zitrat. Pl.-z.—8'; Pl.-f.—krampf.; M. Depl.-z.—5'29''.
14. NaJ. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—4'05''.
15. NaNO₃. Pl.-z.—5'; Pl.-f. konk.—krampf.; M. Depl.-z.—4'40''.
16. Na₂SO₄. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—krampf.; M. Depl.-z.—9'11''.
17. NaCl. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—4'52''.
18. Na-Tartrat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—krampf.; M. Depl.-z.—8'12''.

Die untersuchten Na-Salze fördern die Wasserpermeabilität wie folgt:

CNS > Br > J > (NO₃, Cl, Azetat) > Zitrat > Tartrat > SO₄.

Die Wirkungsdifferenzen sind bei Na-Salzen bei gegebener Konzentration im allgemeinen deutlicher ausgeprägt als bei den K-Salzen, ausgenommen das Nitrat, das Chlorid und das Azetat, die den Wasserdurchtritt fast in gleicher Weise beeinflussen.

III. Rubidium- und Caesiumsalze

19. RbNO₃. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—3'21''.
20. Rb₂SO₄. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—7'44''.
21. RbCl. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—4'20''.
22. Cs₂SO₄. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—8'30''.
23. CsCl. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—4'35''.

Die Rb- und Cs-Salze fördern die Wasserfiltration durch das Plasma wie folgt:

Rb NO₃ > Cl > SO₄
Cs Cl > SO₄.

IV. Ammoniumsalze

24. (NH₄)₂SO₄. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—krampf.; M. Depl.-z.—6'59''.
25. NH₄CNS. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—1'56''.
26. NH₄-Azetat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—2'53''.
27. NH₄Cl. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—4'35''.
28. NH₄-Dizitrat. Pl.-z.—8'; Pl.-f.—krampf.; M. Depl.-z.—5'19''.

Die Ammoniumsalze fördern die Deplamolyse in folgender Weise:

CNS > Azetat > Cl > Dizitrat > SO₄.

V. Lithiumsalze

29. Li-Azetat. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—5'17''.
30. LiBr. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.; M. Depl.-z.—5'28''.
31. LiNO₃. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—5'43''.
32. LiCl. Pl.-z.—5'; Pl.-f.—konk.—krampf.; M. Depl.-z.—5'44''.
33. LiSO₄. Pl.-z.—7'; Pl.-f.—krampf.; M. Depl.-z.—9'53''.

Die untersuchten Li-Salze beeinflussen die Deplasmolyse fast in gleicher Weise, ausgenommen das Sulfat :



B. Erdalkalien

I. Magnesiumsalze

34. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Pl-z.—6'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—2'27''.
35. MgSO_4 . Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.—krampf.; M. Depl-z.—5'54''.
36. Mg-Azetat.¹⁾ Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—4'21''.
37. MgCl_2 . Pl-z.—7'; Pl-f.—konkave; M. Depl-z.—3'39''.
38. MgBr_2 . Pl-z.—6'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—4'42''.

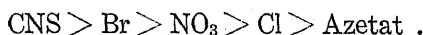
Die Mg-Salze beeinflussen die Wasserpermeabilität wie folgt :



II. Kalziumsalze

39. $\text{Ca}(\text{CNS})_2$. Pl-z.—6'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—2'03''.
40. Ca Azetat. Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.—krampf.; M. Depl-z.—7'20''.
41. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Pl-z.—6'; Pl-f.—konkave; M. Depl-z.—3'21''.
42. CaBr_2 . Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—2'44''.
43. CaCl_2 . Pl-z.—7'; Pl-f.—konkave; M. Depl-z.—5'33''.

Die untersuchten Ca-Salze erhöhen die Wasserpermeabilität nach der Reihenfolge :

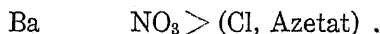
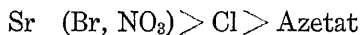


III. Strontium- und Bariumsalze

44. $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$. Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—3'53''.
45. $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$. Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—4'33''.
46. SrBr_2 . Pl-z.—6'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—4'22''.
47. SrCl_2 . Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—6'47''.
48. BaCl_2 . Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—4'55''.
49. Ba-Azetat. Pl-z.—7'; Pl-f.—konk.; M. Depl-z.—4'51''.
50. Sr-Azetat. Pl-z.—7'; Pl-f.—krampf.; M. Depl-z.—7'43''.

Sr-Azetat ist für das Plasma sehr giftig. Die Kontrollplasmolyse mit 0,4 mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ nach der Beendigung des Versuches zeigt viele tote Zellen.

Sr- und Ba-Salze fördern die Wasserpermeabilität wie folgt :



51. Saccharose 0,495 mol, isotonisch 0,3 mol KNO_3 .
Pl-z.—15'; M. Depl-z.—10'19''. Pl-z.—20'; M. Depl-z.—9'55'';
Pl-z.—35'; M. Depl-z.—10'24''.

1) Reagiert stark alkalisch. Mit Essigsäure neutralisiert.

Besprechung der bisherigen Ergebnisse

Die Resultate der Versuche mit den Alkalisalzen sind in der Übersichtstabelle 1 zusammengestellt.

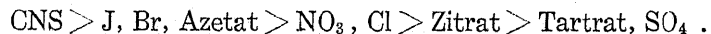
Übersichtstabelle 1

Die Zahlen bedeuten die Deplasmolysezeiten in Minuten und Sekunden

Anion Kation	CNS	J	Br	Azetat	NO ₃	Cl	Zitrat	Tartrat	SO ₄
Rb	—	—	—	—	3 ²¹	4 ²⁰	—	—	7 ⁴⁴
Cs	—	—	—	—	—	4 ²⁵	—	—	8 ⁵⁰
K	2 ²²	2 ³⁶	3 ¹⁴	3 ³⁴	4 ³⁹	4 ³³	6 ⁴⁴	8 ⁰⁰	6 ⁴²
NH ₄	1 ⁵⁶	—	—	2 ⁵³	—	4 ²⁵	—	—	6 ⁵⁹
Na	1 ⁵³	4 ⁰⁵	2 ²⁴	4 ⁵⁸	4 ⁴⁰	4 ⁵²	5 ²⁹	8 ¹²	9 ¹¹
Li	—	—	5 ²³	5 ¹⁷	5 ⁴³	5 ⁴⁴	—	—	9 ⁵³

Ein Blick auf diese Tabelle zeigt, daß hier lyotrope Einflüsse der Salze unverkennbar sind. Ferner sieht man, daß die Anionen die Wasserbewegung mehr beeinflussen als die Kationen. Die Wasserpermeabilitätsförderung seitens der Anionen der Salze, d.h. die lyotropen Anionenreihen stimmen bei verschiedenen Salzen wohl nicht gänzlich überein. Dieses ist dadurch bedingt, daß die Wirkungsdifferenzen der in der lyotropen Reihen nebeneinander stehenden Anionen in vielen Fällen in den Grenzen des Versuchsfehlers liegen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei anderen Versuchsbedingungen (anderer Konzentration der Salze u.d.) die Stellung dieser Anionen sich etwas verschieben könnte, die Gesetzmäßigkeit tritt immerhin sehr deutlich hervor. Um stabile Anionenreihen für alle untersuchten Salze zu ermitteln, brauchte man eine sehr große Zahl von Versuchen. Es ist aber fraglich, ob sich das lohnen würde. Jedenfalls werden in schwächeren Konzentrationen die Wirkungsunterschiede der Anionen kleiner und die Verschiebungen in der lyotropen Reihe größer.

Im allgemeinen kann man auf Grund der vorliegenden Versuche, für die Förderung der Wasserbewegung durch das Plasma durch Alkalisalze, folgende Anionenreihe aufstellen:



Für die Alkalkationen können wir nicht ohne weiters eine Förderungsreihe aufstellen, die für alle Salze Gültigkeit haben würde, da die Wirkungsdifferenzen hier oft klein sind. Einzeln betrachtet haben wir für die:

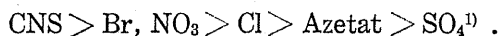
Nitrate	Rb > K, Na > Li
Chloride	Rb, Cs, K, NH ₄ , Na > Li
Sulfate	K, NH ₄ > Rb, Cs > Na, Li
Bromide	Na, K > Li
Azetate	NH ₄ , K > Na > Li

Am häufigsten könnten wir folgende Reihe erwarten: $\text{Rb, Cs, K, NH}_4 > \text{Na} > \text{Li}$, d.h. die vier ersten Kationen fördern die Wasserpermeabilität fast in gleicher Weise, Na und Li etwas schwächer.

DE HAAN (1933) fand für die Epidermiszellen der Zwiebelschuppen von *Allium Cepa* bei der Einwirkung der Nitrate der Alkalisalze folgende Deplasmolysezeiten: $\text{Li}-9'1''$; $\text{Na}-9'6''$; $\text{K}-9'28''$. Diese Reihenfolge zeigt, daß bei einer niedrigeren Salzkonzentration (DE HAAN wandte eine Salzkonzentration isotonisch 0,2 mol Rohrzucker an, = ungef. 0,12 mol KNO_3) die Wirkung des Kations hinter der des Anions zurücktritt, da die Differenzen der Deplasmolysezeiten den Versuchsfehler (nach meiner Schätzung ca. 1 Min.) nicht über treffen.

Die Erdalkalien beeinflussen, wie die Übersichtstabelle 2.

zeigt, die Wasserfiltration prinzipiell in derselben Weise, wie die Alkalisalze. Auch hier treten die Anionenwirkungen besser hervor. Für sie ist diese Reihenfolge maßgebend:



Für die Kationen lassen sich folgende Reihen aufstellen:

Nitrate $\text{Mg} > \text{Ca, Ba} > \text{Sr}$

Chloride $\text{Mg} > \text{Ba} > \text{Ca} > \text{Sr}$

Azetate $\text{Mg} > \text{Ba} > \text{Ca} > \text{Sr}$

Bromide $\text{Ca} > \text{Sr}$

Die Kationenreihe der Chloride und Azetate ist charakteristisch im gegebenen Falle für die Kationenwirkungen der Erdalkalien.

Vergleicht man alle von den Salzen bewirkten Deplasmolysezeiten mit der von der Saccharose bewirkten, so sieht man, daß die Salze die Wasserfiltration durch das Plasma stark beschleunigen.

Alle untersuchten Salzen fördern die Wasserpermeabilität vom Standpunkt der Anionenwirkungen, entsprechend ihrer Eindringungsfähigkeit in die Zelle. Die Alkalisalze und die Alkalierden sind dabei getrennt zu betrachten.

Je schneller ein Salz (im Rahmen seiner Gruppe) in das Plasma eindringt, umso schneller geht die in seiner

Übersichtstabelle 2

Die Zahlen bedeuten die Deplasmolysezeiten in Minuten und Sekunden

Anion Kation	CNS	Br	NO_3	Cl	Azetat	SO_4
Mg	—	—	2 ²⁷	3 ³⁹	4 ²¹	5 ⁵⁴
Ba	—	—	3 ⁵³	4 ⁵⁵	4 ⁵¹	—
Ca	2 ⁰³	2 ⁴⁴	3 ²¹	5 ³³	7 ²⁰	—
Sr	—	4 ²²	4 ³³	6 ¹⁷	7 ⁴³	—

1) Bezieht sich nur auf die Mg-Salze.

Zusammenstellung

Die Zahlen bedeuten wieviel mal die Salze
im Vergleich mit der Saccharose die
Wasserfiltration beschleunigen

Kation Anion	K	Na	Mg	Ca
CNS	4,4	5,4	—	5,0
J	4,0	2,5	—	—
Br	3,7	4,2	—	3,7
Azetat	3,3	2,1	2,3	1,4
NO ₃	2,2	2,2	4,2	3,0
Cl	2,2	2,1	2,8	2,0
Zitrat	1,5	1,9	—	—
Tartrat	1,3	1,2	—	—
SO ₄	1,5	1,1	1,7	—

Lösung ausgeführte
Plasmolyse in Wasser
zurück. Für die Aufnahme
der Alkalisalze habe ich fol-
gende Anionenreihe gefunden
(KAHO, 1921, 1923):

CNS > Br > NO₃ > Cl >
Tartrat > SO₄. Sie ist der
Wasserpermeabilitätsreihe:
CNS > Br > NO₃, Cl > Tart-
rat, SO₄ vollständig identisch.
Die unten angeführten Na-

Salze dringen in die Wurzel-
zellen von *Lupinus luteus* mit einer Geschwindigkeit ein, die ungef.
proportional den Zahlen ist (KAHO l.c.):

NaBr	NaNO ₃	NaCl	Na-Tartrat	Na ₂ SO ₄
59	35	26	16	11

Die Geschwindigkeit der Wasserfiltration in unseren Versuchen ist ungef.
proportional folgenden Zahlen (vgl. Zusammenstellung):

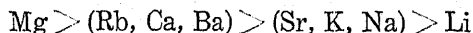
NaBr	NaNO ₃	NaCl	Na-Tartrat	Na ₂ SO ₄
42	22	21	12	11

Diese Gegenüberstellung zeigt eine große Ähnlichkeit der Verhältnisse in
beiden Fällen.

Für die Permeabilität der Salze der Erdalkalien fand ich folgende
Anionenreihe (KAHO, 1924, 1926) CNS > Br > NO₃ > Azetat > Cl > SO₄¹⁾.
Die Wasserpermeabilitätsreihe der Erdalkalien:

CNS > Br > NO₃, Cl > Azetat > SO₄¹⁾ stimmt mit dieser Reihe gut
überein.

Bekanntlich dringen die Erdalkalien in höheren Konzentrationen weit
schwerer in das Plasma ein, als die Alkalisalze. Es ist aber bemerkens-
wert, daß bei der Förderung der Wasserfiltration kein
Unterschied zwischen den wirkungen der Untersuchten
ein- und zweiwertigen Kationen in dem Sinne
besteht, daß die Erdalkalien den Wasserdurchtritt
weniger fördern. So z.B. ergibt sich für die Nitrats folgende
Förderungsreihe:



In dieser Reihe steht Mg mit der Deplasmolysezeit 2'27'' an der ersten
Stelle, Ca mit 3'21'' an der zweiten und dann erst folgen K mit 4'39'' und

1) Das SO₄-Ion bezieht sich auf die Mg-Salze.

Na 4'40''. Von den Salzen, die für die Pflanzenernährung wichtig sind, fördern $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ die Durchlässigkeit des Plasmas für Wasser am besten.

Salzgemische

Bekanntlich findet in Salzgemischen eine gegenseitige Beeinflussung der Permeationsgeschwindigkeit der Salze statt. Gut eindringende Salze fördern die Aufnahme schwer permeierender Salze, wenn sie den letzteren in kleinen Mengen zugesetzt werden (KAHO 1921, 1923, LUNDEGÅRDH und MORAVEK 1924). Andererseits tritt häufig in Salzkombinationen der sog. Ionenantagonismus hervor, eine gegenseitige Hemmung der Aufnahme. Es war von Interesse zu prüfen, inwiefern dieses Ionenphänomen bei der Wasserfiltration zum Vorschein kommt.

Die Salzgemische bei allen untenangeführten Versuchen sind isotonisch 0,3 mol KNO_3 . Die Salzgemische sind aus den Lösungen isotonisch 0,3 mol KNO_3 ohne Verdünnung kombiniert. Hinter jedem Salz steht in Klammern die mittlere Deplasmolysezeit der in seiner reinen Lösung (isotonisch 0,3 mol KNO_3) bewirkten Plasmolyse. Mittlere Deplasmolysezeiten sind die Mittelwerte aus 12–14 Einzeldeplasmolysezeiten.

C. Kombinationen zweier Salze

1. 5 ccm KCNS (2'12'') + 1 ccm CaCl_2 (5'33''). Mittlere Deplasmolysezeit des Gemisches 3'56'', berechnet 2'45''. Das Gemisch hemmt die Wasserfiltration um ca 25%.¹⁾
2. 5 ccm KCNS (do) + 1 ccm CaBr_2 (2'44''). M. Depl.-z. — 1'35'', berechnet — 2'17''. Zunahme der Wasserpermeabilität um ca 23%.
3. 5 ccm KCNS (do) + 1 ccm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (3'21''). M. Depl.-z. — 2'11'', berechnet — 2'23''. Die Zunahme der Wasserpermeabilität liegt innerhalb der Fehlergrenze.
4. 5 ccm KCNS (do) + 2 ccm Ca-Azetat (7'20''). M. Depl.-z. des Gemisches — 3'46'', berechnet 3'40''. Wasserpermeabilität unbeeinflusst!
5. 2 ccm NaBr (3'8'') + 1 ccm Ca-Azetat (7'20''). M. Depl.-z. des Gemisches 6'12'', berechnet 4'32''. Abnahme der Wasserpermeabilität um ca 11%.
6. 2 ccm NaBr (do) + 1 ccm $\text{Ca}(\text{CNS})_2$ (2'3''). M. Depl.-z. d. Gem. — 3'59'', berechnet 2'46''. Abnahme um ca 25%.
7. 5 ccm NaBr (do) + 1 ccm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (3'21''). M. Depl.-z. d. Gem. — 4'22'', berechnet — 3'10''. Abnahme um ca 14%.
8. 5 ccm NaBr (do) + 1 ccm CaCl_2 (5'33''). M. Depl.-z. — 7'24'', berechnet — 3'32''. Abnahme um ca 81%.
9. 4 ccm KNO_3 (4'42'') + 1 ccm MgCl_2 (3'59''). M. Depl.-z. — 3'15'', berechnet — 4'29''. Zunahme um ca 10%.
10. 4 ccm KNO_3 (do) + 1 ccm $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (2'27''). M. Depl.-z. — 3'47'', berechnet — 4'31''. Zunahme liegt innerhalb der Fehlergrenze.
11. 4 ccm KNO_3 (do) + 1 ccm MgBr_2 (4'42''). M. Depl.-z. — 2'53'', berechnet — 4'42''. Die Zunahme der Geschwindigkeit der Wasserfiltration um ca 31%.

1) Bei dem Ausrechnen der %%, ist überall der Versuchsfehler abgezogen.

12. 4 ccm KNO_3 (do)+1 ccm Mg-Azetat (4/21''). M. Depl.-z. des Gemisches—5/25'', berechnet—4/38''. Abnahme der Wasserpermeabilität um ca 3%.
13. 2 ccm KNO_3 (do)+1 ccm MgSO_4 (5/54''). M. Depl.-z.—7/7'', berechnet—5/30''. Abnahme um ca 30%.
14. 5 ccm KJ (1/55'')+1 ccm CaCl_2 (5/33''). M. Depl.-z.—1/51'', berechnet—2/31''. Zunahme um ca 18%.
15. 5 ccm KJ (do)+1 ccm MgCl_2 (3/39''). M. Depl.-z.—1/53'', berechnet—2/12''. Die Zunahme liegt innerhalb der Fehlergrenze.
16. 5 ccm KJ (do)+1 ccm MgSO_4 (5/54''). M. Depl.-z.—2/48'', berechnet—2/35''. Keine Beeinflussung!
17. 5 ccm KJ (do)+1 ccm SrCl_2 (6/47''). M. Depl.-z.—2/23'', berechnet—2/44''. Die Zunahme der Wasserpermeabilität liegt innerhalb der Grenze des Versuchsfehlers.
18. 5 ccm KJ (do)+1 ccm BaCl_2 (4/55''). M. Depl.-z.—2/38'', berechnet—2/45''. Die Abnahme der Wasserpermeabilität liegt innerhalb der Grenze des Versuchsfehlers.
19. 4 ccm NaCNS (2/8'')+1 ccm MgCl_2 (3/39''). M. Depl.-z.—3/22'', berechnet—2/26''. Die Abnahme der Wasserfiltration beträgt ca 21%.
20. 4 ccm NaCNS (do)+1 ccm CaCl_2 (5/33''). M. Depl.-z.—4/54'', berechnet—2/49''. Die Abnahme beträgt ca 56%.
21. 4 ccm NaCNS (do)+1 ccm SrCl_2 (6/47''). M. Depl.-z.—4/42'', berechnet 3/4''. Die Abnahme der Wasserfiltration durch das Gemisch beträgt ca 32%.
22. 4 ccm NaCNS (do)+1 ccm BaCl_2 (4/55''). M. Depl.-z.—2/34'', berechnet—2/41''. Die Abnahme liegt innerhalb der Grenze des Versuchsfehlers.

Zusammenstellung von Kombinationen zweier Salze.

KCNS	+	Ca-Salze				
		Br	NO_3	Cl	Azetat	
		+23%	0	-25%	0	
KJ	+	Chloride der Erdalkalien				
		Mg	Ca	Sr	Ba	MgSO_4
		0	+18%	0	0	0
KNO_3	+	Mg-Salze				
		Br	NO_3	Cl	Azetat	SO_4
		+31%	0	+10%	+3%	-30%
NaCNS	+	Chloride der Erdalkalien				
		Mg	Ca	Sr	Ba	
		-21%	-56%	-32%	0	
NaBr	+	Ca-Salze				
		CNS	NO_3	CL	Azetat	
		-25%	-14%	-81%	-11%	

Die Zusammenstellung von Kombinationen aus zwei Salzen zeigt, daß nur die Gemische der Kaliumsalze mit den Erdalkalien die Permeabilität des Plasmas für Wasser erhöhen (in 5 Fällen, mit + bezeichnet). In der Hälfte der Fälle wird die durch das K-Salz, als das Hauptsalz, bewirkte Wasserpermeabilität durch die zugesetzten Erdalkalien nicht herabgesetzt (mit 0 bezeichnet). Nur in zwei Fällen sehen wir eine Verminderung der Permeabilität.

Obwohl für diese Versuche gut permeirende Salze, als Hauptsalze gewählt werden, sehen wir in den Kombinationen mit den Na-Salzen, mit

Ausnahme eines Falles (0), überall eine starke Herabsetzung der Wasserdurchlässigkeit (mit „—“ bezeichnet).

D. Kombinationen mit drei Salzen

23. 8 ccm NaCNS (2/8'') + 1 ccm MgCl₂ (3/39'') + 1 ccm CaCl₂ (5/33''). Mittlere Depl.-asmolysezeit—2/16'', berechnet—2/41''. Die kleine Zunahme ist in den Grenzen des Versuchsfehlers.
24. 8 ccm NaCNS (do) + 1 ccm CaCl₂ (5/33'') + 1 ccm MgSO₄ (5/54''). M. Depl.-z.—1/50'', berechnet—2/51''. Zunahme der Wasserpermeabilität um ca 24%.
25. 8 ccm NaCNS (do) + 1 ccm MgCl₂ (3/39'') + 1 ccm BaCl₂ (4/55''). M. Depl.-z.—4/9'', berechnet—2/34''. Abnahme der Wasserpermeabilität um ca 45%.
26. 8 ccm NaNO₃ (4/14'') + 1 ccm CaCl₂ (5/53'') + 1 ccm MgSO₄ (5/54''). M. Depl.-z.—3/54'', berechnet—4/32''. Kleine Zunahme der Permeabilität um ca 4%.
27. 8 ccm NaNO₃ (do) + 2 ccm CaCl₂ (do) + 2 ccm MgSO₄ (do). M. Depl.-z.—3/25'', berechnet—4/44''. Zunahme um ca 24%.
28. 8 ccm NaNO₃ (do) + 1 ccm SrCl₂ (6/47'') + 1 ccm MgCl₂ (3/39''). M. Depl.-z.—3/7'', berechnet—4/26''. Zunahme um ca 18%.

Zusammenstellung der Kombinationen mit drei Salzen

1.	8 NaCNS	+	1 MgCl ₂	+	1 CaCl ₂	—	0	
2.	„	+	1 CaCl ₂	+	1 MgSO ₄	—	+ 24%	+ Zunahme
3.	„	+	1 MgCl ₂	+	1 BaCl ₂	—	— 45%	— Abnahme
4.	8 NaNO ₃	+	1 CaCl ₂	+	1 MgSO ₄	—	+ 4%	0 Indifferent
5.	„	+	2 CaCl ₂	+	2 MgSO ₄	—	+ 24%	
6.	„	+	1 SrCl ₂	+	1 MgCl ₂	—	+ 18%	

Im Gegensatz zu den Gemischen aus zwei Salzen sehen wir bei den Kombinationen mit drei Salzen (mit denselben Hauptsalzen NaCNS und NaNO₃) fast überall eine Zunahme der Wasserpermeabilität. Unter 6 Fällen sind 4 Zunahmen, ein Fall indifferent und eine Abnahme. Die beiden letzteren ergaben sich, wenn die zugesetzten Erdalkalien beide Chloride sind. Es ist bemerkenswert, daß eine Zunahme der Permeabilität in dem Falle stattfindet, wenn alle Ionen verschieden sind.

E. Kombinationen mit 4–7 Salzen

Chloride der Alkalisalze

29. 1 RbCl¹⁾ (4/20'') + 1 KCl (4/33'') + 1 NaCl (4/52'') + 1 LiCl (5/44''). Pl.-f.—konk.—krampf. M. Depl.-z.—5/32'', berechnet—4/52''. Die kleine Abnahme der Filtrationsgeschwindigkeit liegt in den Grenzen des Versuchsfehlers.

Chloride der Alkalierden

30. 1 CaCl₂ (5/33'') + 1 MgCl₂ (3/39'') + 1 BaCl₂ (4/55'') + 1 SrCl₂ (6/47''). Pl.-f.—konk.—krampf. M. Depl.-z.—6/35'', berechnet—5/13''. Abnahme der Wasserpermeabilität um ca 6%.

1) 1 RbCl bedeutet 1 ccm RbCl usw.

Verschiedene Alkalisalze, ohne Alkalierden

31. 1 KCl (4/33'') + 1 NaNO₃ (4/14'') + 1 KH₂PO₄ (4/30'') + 1 Na₂SO₄ (9/11''). Pl-f.—konk. M. Depl.-z.—4/4'', berechnet—5/37''. Zunahme der Wasserpermeabilität um ca 10%.

Alkalisalze und Alkalierden

32. 1 KCl (4/33'') + 1 NaNO₃ (4/14'') + MgSO₄ (5/54'') + 1 CaCl₂ (5/33''). Pl-f.—konk. M. Depl.-z.—2/51'', berechnet—5/3''. Zunahme der Permeabilität um ca 57%.

In den nachstehenden vier Versuchen sind alle Ionen der Nährsalze (auch Na- und Cl-Ion), mit Ausnahme des Eisens¹⁾, vertreten.

33. 1 KCl (4/33'') + 1 Ca (NO₃)₂ (3/21'') + 1 KNO₃ (4/39'') + 1 KH₂PO₄ (4/30'') + MgSO₄ (5/54''). Pl-f.—konk. M. Depl.-z.—2/35'', berechnet—4/35''. Zunahme der Wasserpermeabilität um ca 65%.
34. 2 CaCl₂ (5/33'') + 1 NaNO₃ (4/14'') + 1 KCl (4/33'') + 1 KH₂PO₄ (4/30'') + 1 MgSO₄ (5/54'') + 1 MgCl₂ (3/39''). Pl-f.—konk. M. Depl.-z.—1/53'', berechnet—3/54''. Zunahme der Filtrationsgeschwindigkeit um ca 100%.
35. 2 KNO₃ (4/39'') + 1 Ca (NO₃)₂ (3/21'') + 1 KH₂PO₄ (4/30'') + 1 KCl (4/33'') + 1 CaCl₂ (5/33'') + 1 MgCl₂ (3/39'') + 1 MgSO₄ (5/54''). Pl-f.—konk.; M. Depl.-z.—2/23'', berechnet—4/36''. Zunahme der Filtr.-Geschw. um ca 69%.
36. 1 CaCl₂ (5/33'') + 1 Ca(NO₃)₂ (3/21'') + 1 MgCl₂ (3/39'') + 1 KCl (4/33'') + 1 KH₂PO₄ (4/30'') + MgSO₄ (5/54''). Pl-f.—konk.; M. Depl.-z.—2/56'' berechnet—4/35''. Zunahme der Wasserpermeabilität um ca 40%.

Ohne Ca-Salze

37. 1 SrCl₂ (6/47'') + 1 BaCl₂ (4/55'') + 1 MgCl₂ (3/39'') + 1 Sr(NO₃)₂ (4/33'') + 1 KH₂PO₄ (4/30'') + 1 KCl (4/33''). Pl-f.—konk.—krampf. M. Depl.-z.—5/5'', berechnet—4/50''. Die kleine Abnahme der Permeabilität liegt innerhalb der Grenze des Versuchsfehlers.

Ein Gemisch von Salzen mit denselben Anionen, wie die Chloride der Alkalisalze (N° 29) oder die der Alkalierden (N° 30), begünstigt nicht die Wasserfiltration, in beiden Fällen ergibt sich eine kleine Abnahme der Permeabilität. Dagegen bewirkt eine Kombination der Alkalisalze mit verschiedenen Anionen unter sich, schon eine kleine Zunahme der Permeabilität (N° 31). Die Filtrationsgeschwindigkeit steigt beträchtlich in dem Falle, wenn in den Kombinationen Alkalisalze und Alkalierden mit verschiedenen Anionen vertreten sind (N° 32).

Inbesondere hohe Wasserpermeabilität bewirken die Kombinationen der Ionen der Nährsalze: K-, Ca-, Mg-, H₂PO₄-, NO₃-, SO₄- Ion, sowie auch das Na- und Cl- Ion, zum besseren physiologischen Gleichgewicht der Lösungen. (N° 33–36). In einigen Fällen wird die Wasserfiltration bis um 100% beschleunigt (s. N° 34) im Vergleich mit dem Mittelwert aus den einzelnen Deplasmolysezeiten.

Der Versuch CaCl₂ und Ca(NO₃)₂ durch die betreffenden Sr-Salze zu ersetzen, führte zu einer kleinen Abnahme der Wasserpermeabilität (N° 37).

1) Da die Konzentration der Eisen-Ionen in Nährlösungen, mit der der anderen Ionen verglichen, sehr niedrig ist, so können wir ihre Wirkung bezüglich der Wasserpermeabilität unberücksichtigt lassen.

Schlußbetrachtungen

Die vorliegenden Versuche haben wenn auch in groben Umrissen, gewisse Gesetzmäßigkeiten der Salzwirkungen in bezug auf die Wasserpermeabilität ergeben. Mit den hohen Konzentrationen der Salze, die in Bodenlösungen in der Regel nicht vorkommen, und mit der gewaltsamen Methode der Plasmolyse sind Bedingungen geschaffen, die im natürlichen Leben der Pflanze nie stattfinden.

Ich würde es nicht wagen zu behaupten, daß die mit der plasmolytischen Methode gefundenen Gesetzmäßigkeiten für natürliche Bedingungen gewisse Geltug haben, wenn nicht eine ganze Reihe von Autoren (s. die Zusammenstellung der Literatur bei LUNDEGÅRDH 1932) mit dieser Methode zu Ergebnissen gelangten, die später mit besseren Methoden bestätigt wurden. So sagt LUNDEGÅRDH in seiner Monographie „Die Nährstoffaufnahme der Pflanze“ (1932) folgendes: „Als Hauptergebnis der in diesem Kapitel gegebenen Literaturübersicht über Permeabilitätsfragen scheint hervorzugehen, daß bei der Aufnahme von Elektrolyten in die Pflanzenzelle ganz generelle Gesetzmäßigkeiten obwalten die in naher Beziehung zu den allgemeinen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Ionen stehen. Wichtig und in methodischer Hinsicht interessant erscheint mir hierbei die Tatsache, daß die mit den theoretisch nicht unanfechtbaren Plasmolyse- und Gewebespannungsmethoden erreichten Resultate vielfach durch andere und zuverlässigere Methoden bestätigt wurden, und daß die bei starken Lösungen und unter gewaltsamer Störung des Quellungsgrades des Plasmas beobachteten Permeabilitätserscheinungen doch in großen Zügen bei der Wirkung verdünnter Lösungen unter natürlichen Imbibitionsverhältnissen des Plasmas wiedergefunden werden“.

Ich glaube, daß die Ergebnisse dieser Versuche gewisse Richtlinien für eine vorläufige Orientierung, soweit sie die Salzwirkung betrifft, beibringen werden.

Für die Untersuchung der Aufnahme der Stoffe in die Zelle haben wir eine Auswahl von Methoden, von denen die chemische Analyse die zuverlässigste ist. Bei der Untersuchung der Wasserpermeabilität sind wir in erster Linie auf die plasmolytische Methode angewiesen. Die Gewebespannungsmethode würde gewisse Vorteile bieten, man müßte aber dabei die Elastizitätsverhältnisse der Zellwände des Objektes genau kennen, was eine Frage für sich ist,

Ist bei der Anwendung der plasmolytischen Methode Plasmolyse oder Deplasmolyse mehr geeignet für die Untersuchung der Wasserpermeabilität?

HÖFLER (1930) fand, daß „die Wasserpermeabilität ist während der Deplasmolyse vielleicht größer als während der Plasmolyse ist“. HUBER und HÖFLER (1930) sagen: „wir sind also der Überzeugung, daß die Deplasmolyse als solche Bedingungen schaffen kann, die die ursprüngliche

Wasserpermeabilität des Plasmas bedeutend erhöhen“. DE HAAN (1933) findet, daß die Wasserpermeabilität bei der Deplasmolyse sich manchmal mehr als dreimal gegenüber der Plasmolyse vergrößert. Können wir die Wasserfiltrationsgeschwindigkeit bei der Plasmolyse als eine ursprüngliche, als eine normalen Bedingungen entsprechende Wasserbewegung ansehen, insbesondere wenn man die Plasmolyse in einer Zuckerlösung ausführt? Ich glaube nicht, und zwar aus folgende Gründen. 1) WALTER (1923) hat in einwandfreier Weise gezeigt, daß in Rohruckerlösungen immer eine weitgehende Entquellung des Plasmas eintritt. Bei den Karposporen von *Lemanea* tritt in der Zuckerlösung eine Volumverminderung des Plasmas infolge der Entquellung ein wie folgt:

In Wasser	Rohrzucker		Gesättigte Lösung ungef. 2,6 mol
	1/2 mol	1 mol	
1,39	1,24	1,00	0,68

Das Plasma wird also in der Saccharoselösung (bzw. in einer Monoselösung) während der Plasmolyse immer mehr und mehr verdichtet.

2) Infolge der Kontraktion, nimmt die Dicke des Plasmas zu. Nach DE HAAN (l.c.) nimmt das Plasma der Zwiebelshuppenzellen von *Allium Cepa* (in 0,646 mol Saccharose 15 Min. plasmolysiert) während der Deplasmolyse in Wasser bis 5/8 (62,5%) an Dicke ab. Dieses zeigt, daß bei der Plasmolyse das Plasma derselben Zellen an Dicke etwa um 5/8 des Anfangswertes zunehmen würde.

3) Auf das Abheben des Plasmas von der Zellwand wird (auch in dem Falle, wenn die Volumverminderung plasmometrisch verfolgt werden kann) ein gewisser Teil der osmotischen Energie verbraucht und die Filtrationsgeschwindigkeit entsprechend herabgesetzt. Das Plasma ist bei allen Pflanzen mit der Zellwand mehr oder weniger dicht verbunden.

Nach HANSTEEN-CRANNER (1922, 1925) stellt die Zellwand ein kolloides Netzwerk dar, welches von einem Gerüst locker bindender und sich chemisch verändernder Plasmastoffe durchsetzt ist.

Bei der Plasmolyse wird das Plasma von der Zellwand abgerissen (vgl. HECHT, 1912), insbesondere wenn die Plasmolyse mit einer Zuckerart oder mit einem quellungshemmenden Salz ausgeführt ist. Durch diese Stoffe werden Plasmafäden, die die Zellwand durchsetzen, entquollen (verdichtet) und das Abreißen des Plasmabelages erschwert.

4) Mono- und Disaccharide sind als Plasmolytika für das Plasma gänzlich unschädlich. Es wird still schweigend angenommen, daß bei der mit diesen Stoffen ausgeführten Plasmolyse die Wasserfiltrationsgeschwindigkeit als die für das Plasma normale oder „ursprüngliche“ anzu-

sehen sei. Dieses ist unrichtig. Tatsächlich ist in diesem Falle die Wasserpermeabilität stark herabgesetzt.

Abgesehen von der entquellenden Wirkung (WALTER l.c.), werden durch Saccharose und Monosaccharide Oberflächenphosphatide gefällt, wodurch eine Verdichtung der Plasmaoberfläche zustande kommt.

KÜSTER (1909, 1910) beobachtete die Bildung einer starken Haptogenmembran bei Küchenzwiebelzellen, wenn sie längere Zeit in einer 1 mol Saccharoselösung plasmolysiert wurden. Nach WEIS (1925) bewirkt Glukose eine Fällung der Kolloide der Plasmaoberfläche, wobei dieser Zucker nach seiner Aktivität eine Stellung zwischen K und Mg einnimmt. HANSTEEN-CRANNER (l.c.) fand, daß 0,5 mol Glukose in löslichen Fraktionen der Phosphatide Fällungen hervorruft.

Bekanntlich verläuft die Plasmolyse in den Lösungen verschiedener Zucker viel langsamer als in isotonischen Salzlösungen. In der Regel hängt dieses nicht von dem langsamen Eindringen der Zuckerlösungen durch die Zellwand ab, da auch die nachherige Deplasmolyse in Wasser, verhältnismäßig doch langsam vor sich geht. Man kann sich durch Versetzen der Zuckerlösung mit einem indifferenten Farbstoff¹⁾ leicht davon überzeugen, daß sie (Saccharose, Glukose, Fruktose) bei der Plasmolyse die Zellwand leicht passiert. Die Ursachen der Langsamkeit der Plasmolyse in Zuckerlösungen sind folglich a) Entquellung des Plasmas durch das Plasmolytikum, b) Fällung der Oberflächenphosphatide (Bildung einer dichteren Oberflächenschicht). Nach der Plasmolyse zu beurteilen, gleichen die Zuckerlösungen stark entquellendwirkenden Salzen, wie die Zitrats und Sulfate. In den vorliegenden Versuchen setzt die Saccharose die Wasserfiltration etwas mehr herab, als das stark entquellendwirkende Li-Sulfat! Der Unterschied zwischen den Wirkungen der entquellendwirkenden Salze und Zuckerlösungen (vorausgesetzt eine plasmolysierende Konzentration) besteht darin, daß die Salze, wenn auch langsam in die tiefere Plasmaschichten eindringen und früher oder später, als kolloidaktive Elektrolyte, eine irreversible Plasmakoagulation bewirken. Die verdichtende Wirkung der Zuckerlösungen bezieht sich nur auf die Phosphatide, die das Plasma unter Umständen auch ausscheidet (HANSTEEN-CRANNER l.c. 1925, 1926, 1927). Auf Grund dieser Ausführungen halte ich, daß Plasmolyse, insbesondere wenn sie in einer Zuckerlösung ausgeführt wird, wenig zum Studium der Wasserpermeabilität geeignet ist.

Die stark herabgesetzte Wasserpermeabilität bietet wohl gute Möglichkeiten für Messungen, ein großer Nachteil dabei ist aber, daß man nicht imstande ist den Versuchsfehler auch nur annähernd zu schätzen.

1) Man kann einen kolloiden Farbstoff nehmen, die Farbteilchen sind dann bedeutend größer als die Zuckermoleküle.

Deplasmolyse hat gegenüber der Plasmolyse für die Untersuchung der Wasserpermeabilität gewisse Vorteile. Man kann das Plasmolytikum nur kurze Zeit auf das Plasma einwirken lassen. So genügte in den vorliegenden Versuchen eine Plasmolysezeit von 5 Min. in den quellungsfördernden Salzlösungen, und 7 Min. in den quellungshemmenden. In einigen Salzlösungen werden bei der Anwendung starker Konzentrationen schon nach 15–20 Min. die Wasserhüllen der Plasmakolloide durchbrochen und die Permeabilität stark herabsetzt. Dieses bezieht sich besonders auf die Zellen, die einen dünnen Plasmabelag haben. So z.B. haben Zwiebel-epidermiszellen, wenn sie in NaCl-, LiCl- oder NH_4Cl -Lösungen 0,5 mol 6–8 Min. plasmolysiert werden, eine Deplasmolysezeit von 3–5 Minuten. Verbleiben die Zellen 15–30 Min. in Plasmolytikum, so kann die Deplasmolysezeit drei bis vier mal länger dauern. Wie es mir scheint, dürfte man eine plasmolysierende Salzlösung nicht länger als 8 bis 10 Minuten auf das Plasma einwirken lassen, wenn man nicht eine stark veränderte Durchlässigkeit haben will.¹⁾

Ich habe ferner den Eindruck, als gehe bei der Deplasmolyse in Wasser die Expansion des Plasmaschlauches viel leichter vor sich, und als werde darauf weniger Energie verbraucht, als auf die Kontraktion bei der Plasmolyse. Es scheint mir, daß die Dislokation der Teilchen des entquellenden Plasmas bei der Plasmolyse mehr Energie verbraucht, als bei der Aufquellung während der Deplasmolyse.

Zusammenfassend müßte die Deplasmolyse in Wasser, nach der Plasmolyse in Zucker- oder entquellendwirkenden Neutralsalzlösungen immer schneller vor sich gehen, als die Plasmolyse. Die Deplasmolyse ist mit einer Wiederaufquellung der Plasmakolloide verbunden und durch eine aufgequollene Membran osmiert das Wasser schneller als durch eine entquollene. Es ist aber fraglich, ob der ursprüngliche Quellungsgrad bei diesen Bedingungen erreicht wird.

Wenn die Plasmolyse in einer quellungsfördernden Salzlösung (z.B. KNO_3) langsamer verläuft als die nachherige Deplasmolyse in Wasser, so zeigt dieses deutlich, wie weit Nebenumstände (Anhaften des Plasmas an der Wand u. and.) die Wasserbewegung bei der Plasmolyse beeinflussen können. Ein Salz, das die an der Zellwand anhaftende Plasmaschicht auflöst, wie das sehr stark quellungsfördernde K-Rhodanid, bewirkt eine fast gleichschnelle Plasmolyse und Deplasmolyse in Wasser. In den Alkalisulfaten und -zitratat dagegen geht die Plasmolyse langsamer vor sich, als die Deplasmolyse, da diese Salze die die Zellwand durchsetzenden Plasmafäden verdichten und das Abreißen des Plasmas erschweren. Somit

1) Es ist neuerdings eine interessante Arbeit von LEVITT, SCARTH u. GIBBS (Protoplasma 26, 1936) über die Wasserpermeabilität nackter Protoplasten erschienen. Leider werden in derselben die Zellen der Zwiebelschuppen in stark hypertonischen Lösungen ($\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$) 20–30 Min. lang plasmolysiert. In einigen Fällen dauerte die Plasmolyse sogar $1\frac{1}{2}$ Stunden!

müßte theoretisch der Unterschied zwischen der Plasmolyse- und Deplasmolysezeit nach der lyotropen Reihe $\text{CNS} \rightarrow \text{SO}_4$ zunehmen. Um eine Übersicht über die störenden Umstände bei der Plasmolyse zu gewinnen, müßte man in erster Linie untersuchen, wie sich das Verhältnis zwischen den Geschwindigkeiten der Wasserbewegung bei der Plasmolyse und der Deplasmolyse bei der Einwirkung verschiedener Salze ändert wird.

Gehen wir nun zur kurzen Betrachtung der Ergebnisse. Das deutliche Hervortreten der lyotropen Abhängigkeit bei den Alkalisalzen und Alkalierden zeigt in klarer Weise, daß bei den Salzwirkungen auf die Wasserpermeabilität in erster Linie physikalisch-chemische Gesetzmäßigkeiten maßgebend sind. Wir können hier nur von einer physikalisch-chemischen, aber nicht von einer physiologischen Wasserpermeabilität sprechen. LUNDEGÅRDH ist als erster in einer interessanten Studie zu ähnlichen Folgerungen gekommen, als noch keine speziellen Untersuchungen über die Permeabilitätsprozesse vorlagen. Er sagt (1911, s. 94): „daß bei dem Einfluß der Salze auf die Permeabilität für Wasser wohl eine lyotrope Reihenfolge erwartet werden kann, daß es sich aber anderseits bei der Permeabilität um so viele zusammenstoßende Faktoren handelt, daß der additive Einfluß mehr oder weniger verschleiert werden kann und muß“. Bei seinen Versuchen kam die lyotrope Abhängigkeit nicht genügend deutlich zum Vorschein. DE HAAN (l.c.) findet die HOFMEISTER'sche Reihenfolge für die Wasserpermeabilität bei der Einwirkung folgender Salze (unten Deplasmolysezeiten):

KCNS	KNO ₃	K ₂ SO ₄
6'24''	9'28''	10'

Die Anzahl der Anionen ist hier zu klein um mit Sicherheit ihre lyotrope Wirkung nachzuweisen, übrigens liegt der Wirkungsunterschied bei den zwei letzteren Salzen in den Grenzen des Versuchsfehlers. Eine größere Anzahl von Salzen (etwa 50), die bei unseren Versuchen angewandt wurden, zeigt daß nicht nur bei allen Alkalisalzen, sondern auch bei den Alkalierden der lyotrope Einfluß der Salze der Wasserpermeabilität gegenüber sich sehr deutlich äußert. Es ist dabei hervorzuheben, daß Erdalkalien bei gegebener Konzentration die Wasserbewegung durch das Plasma etwas mehr begünstigen, als Alkalisalze.

Ein großes Interesse bietet die Wirkung der Salzkombinationen. K + Erdalkalien (Gemische aus zwei Salzen) erhöhen ungef. in der Hälfte der Fälle die Wasserpermeabilität, in den übrigen Fällen wirken sie indifferent, d.h. die Deplasmolysezeit ist annähernd ebenso lang, wie die aus den Deplasmolysezeiten der Komponenten berechnete.

Na + Erdalkalien setzen in allen Fällen die Permeabilität für Wasser herab. Gemische aus drei Salzen (Na + Mg + Ca, bzw. Ba oder Sr) bewirken

immer eine Erhöhung der Bewegungsgeschwindigkeit des Wassers, wenn die Kationen mit verschiedenen Anionen verbunden sind. Wenn im Gemisch das Cl-Ion zweimal vertreten war, so ergab sich eine Verminderung der Permeabilität. Wenn im Gemisch vier oder mehr Salze vorhanden waren, so ergab sich folgendes: Alkalisalze oder Erdalkalien mit denselben Anionen bewirkten eine Abnahme der Permeabilität. Waren die Alkalisalze im Gemisch mit verschiedenen Anionen, so ergab sich eine kleine Zunahme der Wasserbewegung. Die letztere wurde stark erhöht, wenn auf das Plasma Alkalisalze und Erdalkalien mit verschiedenen Anionen einwirkten. Die größte Zunahme der Permeabilität für Wasser ergab sich, wenn im Plasmolytikum alle Ionen der Nährsalze (auch das Na- und Cl-Ion) vorhanden waren. In einigen Fällen kam dann die Osmosegeschwindigkeit des Wassers der von den Rhodaniden bewirkten gleich (vergl. Salzkombin. 33-35).

Es entsteht nun die Frage, inwiefern die gefundenen Gesetzmäßigkeiten der Salzwirkungen für natürliche Bedingungen maßgebend sind.

Obwohl Plasmolyse ein gewaltsamer Akt und ein grober Eingriff in die feinere Zellmechanik ist, haben die Versuche doch gezeigt, daß die Permeabilität des Plasmas für gelöste Stoffe sich während der Plasmolyse bzw. Deplasmolyse nicht qualitativ verändert und in den Hauptzügen bestehen bleibt. So hat man mit der Plasmolyse (FITTING 1915, TRÖNDLE 1918) und mit der Gewebespannungsmethode (KAHO 1921, 1923) gefunden, daß die Aufnahme der Neutralsalze nach der lyotropen Reihenfolge vor sich geht. NIKLEWSKI, KRAUS und LEMANCZYK (1928) zeigten, daß die Aufnahme von Salzen aus schwachen Lösungen (0,025 n) durch Gerste nach der Reihenfolge $\text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{SO}_4 > \text{H}_2\text{PO}_4$ erfolgt. LUNDEGÅRDH (1932) fand auf Grund ausgedehnter Versuche, daß Weizenpflanzen aus K-Salzen (0,01 n-0,005 n) im Laufe von 6 Tagen folgende Mengen der Salze aufnahmen: KNO_3 -2,120 mg; KCl -1,691 mg; KH_2PO_4 -1,612 mg; K_2SO_4 -1,268 mg. Nach diesen Daten beeinflussen die Anionen die Aufnahme nach der lyotropen Reihenfolge: $\text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{H}_2\text{PO}_4 > \text{SO}_4$. Ferner haben WIERINGA (1930), TSUNG - LÊ LOO (1931) und and. bei verschiedenen Objekten gezeigt, daß die Aufnahme der Salze aus schwachen (physiologisch normalen) Lösungen nach der lyotropen Reihenfolge vor sich geht. Aus dem Angeführten ist zu sehen, daß mit Methoden, die natürlichen Bedingungen sehr nahe stehen, Ergebnisse gewonnen sind, die mit den Resultaten der Plasmolyseversuche im vollen Einklang stehen. Ich will damit nicht behaupten, daß die Plasmolysemethode für die Untersuchung der Permeabilität geeignet ist. Man kann mit dieser Methode die Hauptgesetzmäßigkeiten, so zu sagen, nur in groben Umrissen aufklären.

Pflanzenzellen sind beständig in Kontakt mit Elektrolyten, die im Grundwasser gelöst sind und mit dem Transpirationsstrom in der Pflanze weiter befördert werden.

Vorausgesetzt, daß die Permeabilität in unseren Versuchen sich qualitativ nicht geändert hat, bleibt doch ein großer Unterschied bestehen zwischen den Versuchsbedingungen und den natürlichen Verhältnissen, bei welchen Zellen in der Regel mit sehr schwachen Lösungen in Berührung kommen. Die Frage ist also, wie würden sich die gefundenen Gesetzmäßigkeiten mit der Konzentration Verminderung der Lösungen ändern. Man könnte, denken, daß in schwachen Lösungen, analog der Salzaufnahme, die Gesetzmäßigkeiten im Großen Ganzen bestehen bleiben, die Wirkung der Salze (resp. Salzgemische) aber schwächer wird. Man muß dabei in Betracht ziehen, daß in unseren Versuchen die Salze nur eine kurze Zeit (5–7 Min.) auf das Plasma einwirkten, und daß das Objekt einen außerordentlich dicken Plasmabelag hat. Andererseits können in natürlichen Bedingungen schwache Elektrolytlösungen einen stärkeren Einfluß auf das Plasma ausüben, als man das aus ihrer Konzentration schließen könnte, da 1. die Lösungen die ganze Zeit mit Plasma im Kontakt sind und 2. die Zellen in der Regel einen dünnen Plasmabelag haben.

Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es wurde die Beeinflussung der Wasserpermeabilität der Pflanzenzellen durch Neutralsalze mit der plasmolytischen Methode untersucht. Es wurden Staubfädenhaare von *Tradescantia virginica* in Neutralsalzlösungen, isotonisch 0,3 mol KNO_3 , im Laufe von 5–7 Minuten plasmolytisiert, und die Zeiten der Deplasmolyse in Leitungswasser bestimmt.

2. In der Abhängigkeit vom Anion nimmt bei den Alkalisalzen das Vermögen die Wasserosmose zu fördern, nach den folgenden lyotropen Reihenfolgen ab:

Kaliumsalze	$\text{CNS}, \text{J} > \text{Br}, \text{Azetat} > \text{Cl}, \text{NO}_3 > \text{SO}_4, \text{Zitrat}, \text{Tartrat}.$
Natriumsalze	$\text{CNS} > \text{Br} > \text{J} > \text{NO}_3, \text{Cl}, \text{Azetat} > \text{Zitrat} > \text{Tartrat} > \text{SO}_4$
Ammoniumsalze	$\text{CNS} > \text{Azetat} > \text{Cl} > \text{Dizitrat} > \text{SO}_4$
Rubidiumsalze	$\text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{SO}_4$
Caesiumsalze	$\text{Cl} > \text{SO}_4$
Lithiumsalze	$\text{Br}, \text{NO}_3, \text{Cl} > \text{SO}_4$

3. Die Wirkungsdifferenzen der Kationen sind weniger ausgeprägt als die der Anionen. Die Kationen fördern die Deplasmolyse wie folgt:

Nitrate	$\text{Rb} > \text{K}, \text{Na} > \text{Li}$
Chloride	$\text{Rb}, \text{Cs}, \text{K}, \text{NH}_4, \text{Na} > \text{Li}$
Sulfate	$\text{K}, \text{NH}_4 > \text{Rb}, \text{Cs} > \text{Na}, \text{Li}$
Bromide	$\text{Na}, \text{K} > \text{Li}$
Azetate	$\text{NH}_4, \text{K} > \text{Na} > \text{Li}$

4. Die Erdalkalien fördern die Wasserbewegung bei den Versuchsbedingungen durchschnittlich mehr als die Alkalisalze. Die Wirkung der Anionen nimmt dabei ab nach den Reihenfolgen :

Magnesiumsalze	$\text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{Azetat}, \text{Br} > \text{SO}_4$
Kalziumsalze	$\text{CNS} > \text{Br} > \text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{Azetat}$
Strontiumsalze	$\text{Br}, \text{NO}_3 > \text{Cl} > \text{Azetat}$
Bariumsalze	$\text{NO}_3 > \text{Cl}, \text{Azetat}$

5. Die Kationenwirkung kommt bei den Erdalkalien, ähnlich wie bei den Alkalisalzen, weniger zum Vorschein und nimmt ab nach den Reihenfolgen :

Nitrate	$\text{Mg} > \text{Ca}, \text{Ba} > \text{Sr}$
Chloride	$\text{Mg} > \text{Ba} > \text{Ca} > \text{Sr}$
Azetate	$\text{Mg} > \text{Ba} > \text{Ca} > \text{Sr}$
Bromide	$\text{Ca} > \text{Sr}$

6. Salzgemische, wenn sie Alkalisalze und Erdalkalien mit verschiedenen Anionen enthalten, erhöhen die Wasserpermeabilität. Besonders günstig, im Sinne der Förderung der Wasserbewegung durch das Plasma, wirken Salzgemische, die alle Ionen der Nährsalze und auch das Na- und Cl-Ion enthalten.

7. Alle untersuchten Salze fördern die Wasserpermeabilität entsprechend ihrer Eindringungsfähigkeit in die Zelle. Die Alkalisalze und die Erdalkalien sind dabei getrennt zu betrachten. Je schneller ein Salz (im Rahmen seiner Gruppe) in das Plasma eindringt, umso schneller geht die in seiner Lösung ausgeführte Plasmolyse in Wasser zurück.

Literaturverzeichnis

- Fitting, H., 1915, *Jahrb. für wiss. Bot.*, 56.
 Grafe, V., 1925, *Biochem. Zeitschr.*, 159. 1926, *Planta*, 2. 1927, *Die Naturwissenschaften*, H. 25.
 Haan, de, Jz., 1933, *Rec. des Travaux Botaniques Neerlandais*, 30.
 Hansteen-Cranner, B., 1922, *Meldninger fra Norges Landbrukshøiskole*, 2; ebenda. 1925, herausgegeben von V. GRAFE.
 Hecht, K., 1912, *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 11.
 Huber, B und Höfler K., 1930, *Jahrb. für wiss. Bot.*, 73.
 Höfler, K., 1930, *Ebenda*.
 Kaho, H., 1921, *Biochem. Zeitschr.*, 123; 1924, *ebenda*, 151; 1923, *Acta et Comm. Universitatis Tartuensis*, A. V. 4. 1926, *Biochem. Zeitschr.*, 167.
 Küster, E., 1909, *Ber. d. deutsch. Bot. Ges.*, 27; 1910, *Zeitschr. f. Bot.*, 2.
 Lundegårdh, H., 1911, *Kungl. Svenska Vetenskaps-akad. Handl.*, 47, No. 3.
 Ders. und Moravek, 1924, *Biochem. Zeitschr.*, 151.
 Niklewski, Krause und Lemanczyk, 1928, *Jahrb. für wiss. Bot.*, 69.
 Tröndle, A., 1918, *Arch. des sciences phys. et nat.*, 45.
 Tsung-Lê Loo, 1931, *Bull. Dep. Biol. Coll. of Sc. Sun Yatsen Univ.*, 10.
 Walter, H., 1923, *Jahrb. für wiss. Bot.*, 62.
 Wieringa, K. T., 1930, *Protoplasma*, 8.

Alterations in Somatic Chromosomes in *Crepis*

By

Olive Swezy

University of California, Berkeley

The chromosomes of *Crepis*, particularly in those species having a small number, afford ideal material for the study of chromosomal variations. These may be due to fragmentation and translocations, in addition to the better known doubling of groups of chromosomes, resulting in polyploidy of various degrees. Heretofore the first group of changes have been described mainly from meiotic divisions. Navashin (1930; 1931) described such changes in the root-tips of *C. tectorum*. Swezy (1935) described the alteration of somatic chromosomes by translocation of the satellite in occasional cells in the root-tips of seven species of *Crepis*, *C. biennis*, *C. ciliata*, *C. pulchra*, *C. artificiales* (*biennis* \times *setosa*), *C. neglecta*, *C. Bungei*, and *C. siberica*. To this list of species of this genus showing occasional somatic chromosomal variations, may now be added one more, *C. Marschallii*, with another type of chromosomal variation in *C. Bungei*.

Material and Methods

The material used for these studies had been fixed a year previously, and consisted only of root-tips taken in the rosette stage. These were fixed in chrom-acetic formalin, using the formula given by Hollingshead and Babcock (1930) as solution I. They were imbedded in paraffin, sectioned at ten microns and stained in iron hematoxylin. A Leitz 1/12 oil immersion objective and Leitz periplane oculars were used, and metaphase figures studied exclusively.

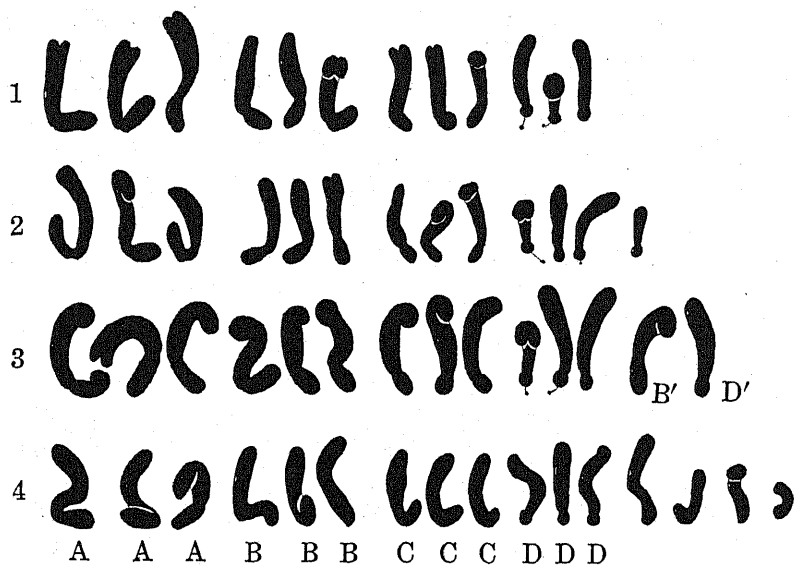
At the time the material was studied the original plants were no longer available, hence no correlation can be attempted between the changes described in the following paragraphs and the characteristics of the plants, or the behavior of the chromosomes in the pollen mother cells and in meiosis.

Numerical Alterations in *Crepis Bungei* Lebed

In examining the progeny of a triploid plant of *C. Bungei*, two plants were found which showed variable counts in the somatic chromosomes in the root-tips. Four plants were examined, one of

which gave a uniform count of 8 chromosomes, another of 9, and the remaining two plants gave 9 and 12 respectively as the dominant number. In plant 1827-3, with 9 chromosomes, a few cells were found containing 10 chromosomes. Plant 1827-2 showed a wider range of variation. The number occurring most frequently was 12, but 13, 14, 15, 16, and 17 were also encountered.

Fig. 1 shows the normal genom of 12 chromosomes for the triploid plant of this species. Two types of alteration seem to be taking place in this plant, one of which, shown in Fig. 3, would appear to be due to the non-disjunction of two chromosomes, the extra chromosomes being similar in size and morphology to those of the second and fourth groups (B and D). The second type of variation is shown in Figs. 2 and 4. In these cells chromosomes



Figs. 1-4. Chromosomes of *Crepis Bungei*. $\times 2120$. 1. Typical genom of triploid plant. 2. Chromosome group with one extra chromosome. 3. Group with two extra chromosomes, possibly B- and D-chromosomes. 4. Group with an extra B-chromosome and three smaller fragments or chromosomes.

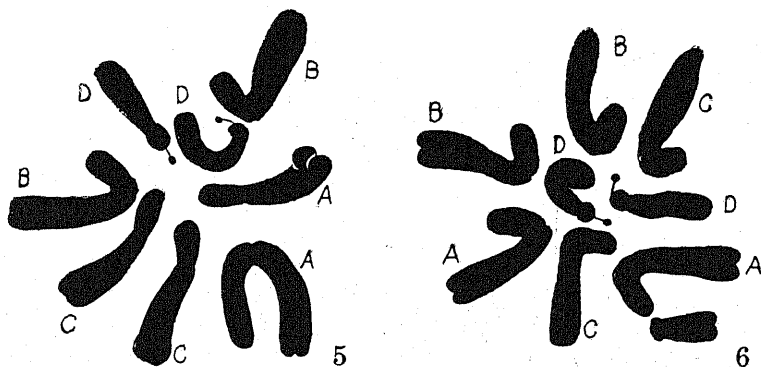
appear which are about half the size of the smallest of those normally found in this species. These, in some cases at least, have all the appearance of normal chromosomes, including a constriction point (Fig. 2). In no case have these seemed to be merely small fragments. No clue to the origin of these chromosomes has been found.

The cells containing these abnormal chromosomes were not segregated in any way, but were associated with cells containing

the normal chromosome number. They occurred in only a very small number of instances in any one root-tip.

Chromosomal Alterations in *C. Marschallii*

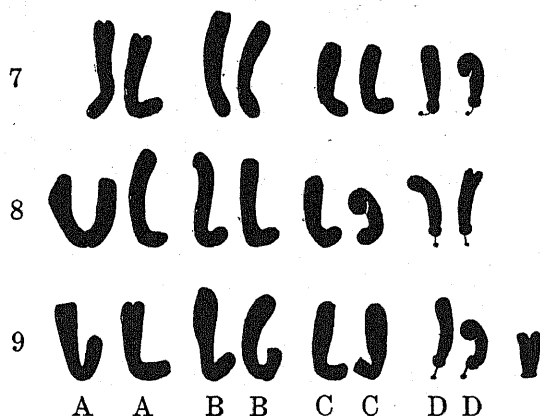
One plant of *C. Marschallii* was found which presented chromosomal alterations differing somewhat from the foregoing. The



Figs. 5, 6. Chromosomes of *Crepis Marschallii*. $\times 3390$. 5. Abnormal group with large V-shaped A-chromosome. 6. Group from another cell in same root-tip without the V-shaped chromosome, but with a small extra chromosome or fragment.

normal diploid genom of this species is shown in Fig. 7, consisting of 8 chromosomes, of which the two longest pairs greatly resemble each other (A- and B-chromosomes). The variations which have appeared in this plant have been observed in the A-chromosomes only, the other pairs retaining their individual morphology throughout.

In some cells of the root-tips of this plant, a large V-shaped chromosome appeared, with no mate of its own size (Fig. 5). When the chromosomes of such cells are arranged in pairs (Fig.



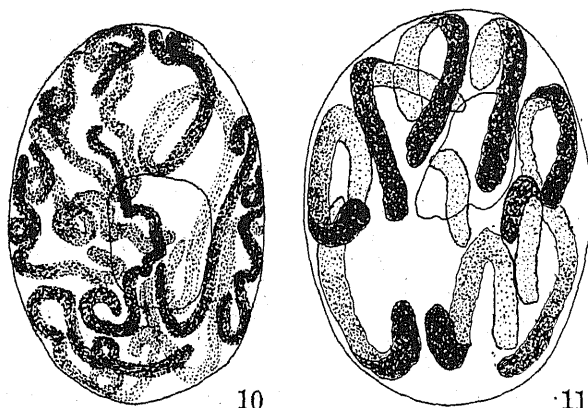
Figs. 7-9. Chromosomes of *Crepis Marschallii*. $\times 2120$. 7. Normal genom of four pairs. 8. Group with V-chromosome. 9. group with extra chromosome.

8), it is found that this large V is one of the A-chromosomes. The constriction is median in some instances and slightly submedian in others, resulting in some variation in the length of the two arms

in this chromosome in different cells. The second A-chromosome is usually noticeably shorter in its proximal arm than the corresponding member of the normal group. In the case of the V-shaped chromosome, the distal arm seems to vary little if at all from the corresponding portion in the normal group. The change is due to an addition to the length of the proximal arm, making it nearly if not quite as long as the distal arm. The shortening of the proximal

arm of the second A-chromosome, however, has never been sufficient to fully account for the increased length of the first A-chromosome.

In most of the cells containing normal A-chromosomes in one root-tip of plant 3175-1, a further variation appeared as a small chromosome



Figs. 10, 11. Early prophases in the root-tips of *Crepis Marschallii*, both of which contain 9 chromosomes, $\times 2650$.

or fragment (Figs. 6-9). This usually bore a constriction, giving it the characteristics of a true chromosome. Furthermore, a number of cells were observed in which this fragment was dividing in a manner similar to that of the other chromosomes, indicating its probable status as a true chromosome.

The number of cells showing a V-shaped chromosome varied in the different root-tips, though it was present in all of the 16 that were examined. In some root-tips the number was very scanty, while in two it showed as the predominant type.

Discussion

The wide prevalence of the complicated chromosomal behavior preceding the final division in meiosis, seems to have led to the belief that such phenomena are a necessary prelude to the occurrence of translocations and similar chromosomal changes. However, it has been amply demonstrated that such changes take place in the female mammalian germ cells without the aid of this ritual so prominent in the male germ cells (Swezy, 1933, contains list of literature), suggesting that, while this is an interesting phenomenon giving rise to a whole literature of speculation, it, like the vermiform appendix,

may be merely an evolutionary relic that the male germ cells have not yet succeeded in sloughing off, lagging behind the female cells in this respect. Since much of this literature concerns itself with plants, it is interesting that further proof of the ability of the chromosomes to rearrange themselves, both numerically and in the size of the individual chromosomes, without such spectacular maneuvering, is found in the undoubted evidence of the translocations of parts of definite chromosomes in a number of species of *Crepis*, occurring sporadically in somatic cells. In these cells the changes in size, shape, or number occur before the chromosomes become visible as definite entities.

Careful examination of all the cells throughout the root-tips showing these changes, has brought to light no single instance of variation from the usual prophase of somatic mitoses. In the root-tips showing an extra chromosome in some cells (Fig. 6), the earliest prophases in which the number of threads or chromosomes could be counted, contained either 8 or 9. Two of these are shown in Figs. 12 and 13, each with 9 chromosomes.

Since all the chromosomes in early prophases are much longer than in later stages, the presence of the V-chromosome could not be established with as much certainty as could be done with an extra chromosome. In the female mammalian germ cells (Evans and Swezy, 1929; Swezy, 1933), the early prophases contain the normal diploid number.

Navashin (1931) has described spontaneous alterations of somatic chromosomes in *C. tectorum* in which large V-shaped chromosomes were formed with no appreciable addition or diminution of the total amount of chromatin in the members involved in the change. He also found that prolonged dormancy (1933) resulted in a large proportion of plants with chromosome changes. After X-rays he found the same type of variations. These are similar to those occurring in *C. Marschallii*. In the latter case some further process seems to have occurred, as the two A-chromosomes together have a greater length than the normal pair.

That the same type of chromosomal alterations occurring after the shock of X-rays is thus duplicated in these somatic chromosome changes, suggests the possibility of the operation of some slight shock during the mobile early period of development. That these changes do not occur in all plants of one generation, would also suggest that such shocks were too slight to affect more than the most sensitive chromosomes at their most critical period.

The change in the satellited chromosomes in *C. siberica* (Swezy, 1935) may have been due to alterations in the meiotic divisions,

since it occurs throughout all of the cells in the root-tips available for study. In the other plants, including those described elsewhere with translocated satellites, these changes are patently due to somatic processes. The lack of continuity of most of these alterations in the somatic cells distinguishes them from those occurring in the germ cells, the latter seeming to be more permanent. This lack of continuity is indicated by the absence of large groups of cells showing the new set-up. In the root-tips of *C. Marshallii* there was no evidence that the large V-chromosome retained this shape through successive mitoses, since this would have invariably resulted in groups of cells with the same type of chromosome.

Certain chromosomes seem to be more easily affected than others in the group. In the seven species showing these alterations, they occurred most frequently in the D-chromosome. In *C. Marshallii* the change was limited to the A-chromosome. The remaining three pairs seemed to be constant in morphology.

With the translocations of the satellite in other species of *Crepis* (Swezy, 1935), all chromosomes were involved, the new positions of the satellite having been found on all members of the group. This appears to be only a transient change, lasting probably through a single mitosis, after which normal relations are reestablished.

The occurrence of extra chromosomes in sporadic cells in *Marshallii*, *siberica*, and *Bungei* presents a phenomenon difficult to explain where these are obviously not the result of non-disjunction. In *Marshallii* cells containing an extra chromosome were quite numerous and showed typical division stages, indicating the probable presence of spindle fibers in the small chromosomes. The lack of groups of cells with this extra chromosome, however, showed its inconstant nature. This would seem to suggest that it behaves as a fragment that is lost at division, yet this assumption would seem to be discredited by the apparent presence of spindle fibers.

Summary

Two plants in the progeny of a triploid of *Crepis Bungei* gave variable counts of chromosomes in sporadic cells in the root-tips, one plant with twelve chromosomes, containing cells with numbers ranging from thirteen to seventeen.

One plant of *Crepis Marshallii* contained cells in its root-tips with a large V-shaped chromosome which had no mate. In one root-tip there was an extra chromosome in cells without the V-chromosome.

Literature Cited

- Evan, H. M., and O. Swezy. 1929. The chromosomes in man : sex and somatic. Mem. Univ. Calif., vol. 9, pp. 1-65.
- Hollingshead, L., and E. B. Babcock. 1930. Chromosomes and phylogeny in *Crepis*. Univ. Calif. Pub. Agr. Sci., vol. 6, pp. 1-53.
- Navashin, M. 1930. Unbalanced somatic chromosomal variation in *Crepis*. Univ. Calif. Pub. Agr. Sci., vol. 6, pp. 95-106.
- 1931. Spontaneous chromosome alterations in *Crepis tectorum* L. Univ. Calif. Pub. Agr. Sci., vol. 6, pp. 201-206.
- 1931. A preliminary report on some chromosome alterations by X-rays in *Crepis*. Amer. Nat., vol. 65, pp. 243-252.
- 1933. Origin of spontaneous mutations. Nature, vol. 131, p. 436.
- Swezy, O. 1933. The changing concept of ovarian rhythms. Quart. Rev. Biol., vol. 8, pp. 423-433.
- 1934. Somatic chromosomal variation in root-tips in *Crepis*. Cytologia, vol. 6, pp. 266-269.
-

**Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides dans
l'ultra-violet éloigné, et le comportement des cellules dans
l'excitation par les courtes longueurs d'onde**

par

Fred Viès

Directeur de l'Institut de Physique biologique¹
de Strasbourg (France)

On sait que depuis quelques années beaucoup de publications ont été consacrées par les bio-chimistes à l'étude des spectres de fluorescence des substances biologiques (principalement DHÉRE¹⁾). Très peu de travaux par contre ont cherché à analyser la topographie spectrale des radiations *excitant* la fluorescence; on peut citer par exemple à ce point de vue les recherches de J. LEWIS²⁾ sur la fluorescence des papiers; celles de BOARDMANN³⁾ sur les dérivés de l'uranyle.

Dans une série de notes récentes,⁴⁾ nous avons commencé à attaquer ce problème, en particulier pour les substances protéiques. Beaucoup de celles-ci, comme on le sait depuis longtemps (STOKES, SORET, STUBEL, etc) sont fluorescentes, et, lorsqu'on les excite par des radiations ultraviolettes, émettent des radiations qui sont en général de l'extrémité violette du spectre visible. Le dispositif que nous avons employé consiste à placer la substance intéressante sur lame de quartz, dans la diacaustique d'un spectrographe en quartz éclairé par un arc au mercure; et on observe ou on photographie la réaction de fluorescence donnée individuellement par chacune des raies du mercure.

Nous donnons ci-dessous, à titre d'exemple, le spectre d'excitation d'une préparation d'*excelsine* (globuline de la noix du Brésil, préparation BONNOT). Cette substance a été examinée en pâte humectée d'eau, sous une épaisseur très faible. Il est facile de reconnaître sur la photographie chacune des raies du mercure qui ont été susceptibles d'exciter la fluorescence (fig. 1).

Les différentes substances protéiques ne sont pas absolument identiques au point de vue de l'excitation de leur fluorescence: quelques-unes présentent un minimum d'excitation dont la position est plus ou moins spécifique; ainsi la sérumalbumine, l'édestine, la caséine, ont un minimum vers λ 275 $m\mu$; des acides aminés peuvent avoir des excitations assez différentes; ainsi la cystine et la leucine paraissent inexcitables.

Dans l'ensemble des recherches que nous avons publiées jusqu'à présent, les radiations excitatrices avaient été observées, vers les courts λ , jusque vers λ 253-248 $m\mu$: tel est le cas par exemple pour la sérumalbumine, le sérum total, la gélatine, la caséine, l'édésine.

Il pouvait être particulièrement intéressant de déceler si dans l'ultraviolet plus éloigné il existe encore des raies excitatrices, peut-être inaperçues parce que moins efficaces. La recherche a été faite en augmentant systématiquement les temps de pose des photographies. Avec du sérum total desséché sur lame, et particulièrement limpide, il a été possible, en portant les temps de pose d'une vingtaine de minutes à 3 ou 4 heures, d'obtenir successivement les raies du mercure λ 240 $m\mu$, 235, 230, 226, et peut-être une au-delà, à la limite de sensibilité des plaques, qui pourrait être 222. La figure ci-jointe montre un spectre obtenu dans ces conditions (fig. 2).

Il semble donc que l'excitation de la fluorescence de protéines puisse se continuer vers l'ultraviolet lointain; il n'est pas contradictoire, au point de vue théorique, que ces excitations deviennent moins efficaces: effectivement, la loi de WAWILOW nous dit que pour la fluorescence d'une substance donnée:

$$\frac{R}{\lambda} = C^{te}$$

R étant le rendement de la fluorescence, c'est-à-dire le rapport de l'énergie émise par fluorescence à l'énergie incidente d'excitation, et λ la longueur d'onde envisagée; c'est-à-dire que vers les courts λ l'énergie émise diminue plus vite que l'énergie incidente.

Il est important de noter que, si l'on considère des cellules entières vivantes, la fluorescence des protéines de leur protoplasma peut, dans une excitation par des radiations de courtes longueurs d'onde, n'être pas seule en jeu; d'autres constituants cellulaires que les protides jouissent de propriétés analogues, et sont excitables par un ultra-violet plus ou moins lointain: tel est par exemple le cas de la cellulose. On devra donc s'attendre à un phénomène mixte, et il faudrait alors recourir à l'analyse spectrale des radiations émises pour tenter de discerner éventuellement les origines complexes de la fluorescence.

Nous avons, dans ces conditions, étudié l'excitation d'une fluorescence de la couche des cellules épidermiques du bulbe de l'Oignon (*Allium Cepa*). Dans l'ensemble du spectre ultra-violet, cette couche cellulaire montre une fluorescence relativement faible, où l'on reconnaît des plages d'excitation inégale: λ 365 $m\mu$; région très faible sur 334; puis 312, 302, 296, et une région très faible où l'on voit une trace de 280; et enfin trois radiations plus fortes 265 $m\mu$, 253, et

248. Photographiquement, en augmentant les temps de pose jusqu' à 5 heures, on peut déceler successivement les raies extrêmes λ 240 m μ , 238, 235, 232, et aussi, 230 restant invisible, une trace extrêmement faible de λ 226.

La couche cellulaire a donc une gamme d'excitation poussée extrêmement loin, et il faut désormais tenir compte de ce fait dans les problèmes de photochimie biologique.

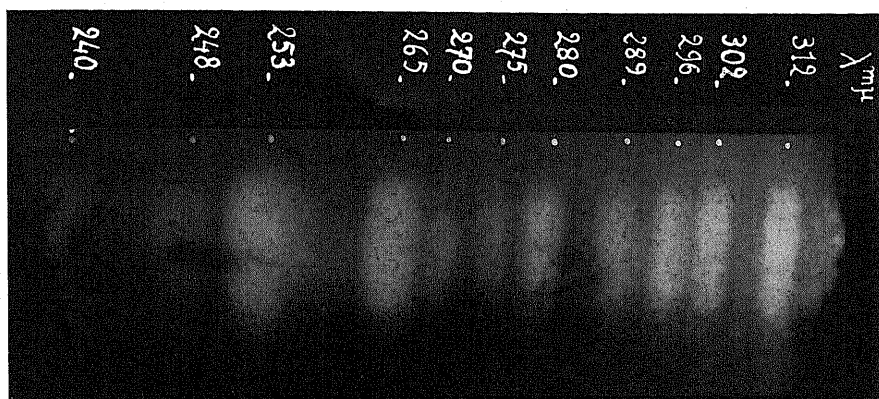
Mais le point capital qui résulte des données expérimentales précédentes est que la zone d'excitation de la fluorescence des protides et des éléments cellulaires vient maintenant se raccorder avec le territoire des "radiations mitogénétiques" que beaucoup d'auteurs, à la suite de Gurwitsch, considèrent comme émises par les organismes vivants; sans prendre parti dans ce dernier problème, il est difficile de nier que les présentes données ne sont pas faites pour en simplifier la discussion.

Bibliographie

- 1) Ch. Dhéré. Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. II, Teil 3, S. 3097-3306, 1933.
- 2) Lewis. *J. Soc. Dyers.* 8, XXXIV, 1918; 2, XL, 1924, etc.
- 3) Boardmann. *Phys. rev.* 20, 2, 552, 1922.
- 4) F. Vlès. *C. R. Ac. Sc.* 202, 2184, 1936.
F. Vlès et A. Ugo. *C. R. Soc. biol.* CXXIII, 226, 1936.

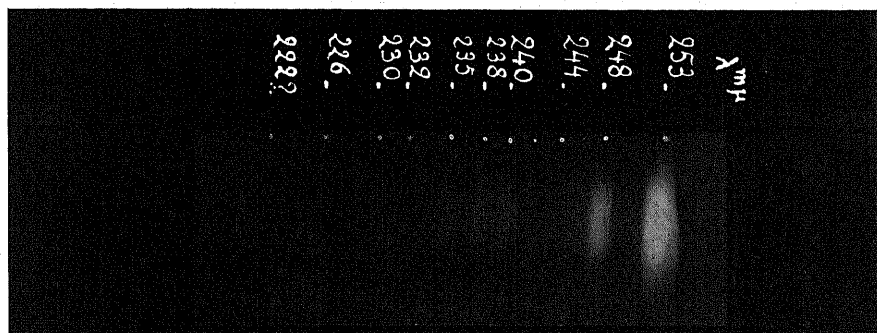
Explication de planche 5

- Fig. 1. Spectre d'excitation de l'excelsine entre λ 312 m μ et λ 240.
- Fig. 2. Spectre d'excitation du serum humain séché, dans l'ultra-violet éloigné du quartz, de λ 253 m μ à λ 222. Pose 2 heures.
- Fig. 3. Spectre d'excitation d'un lambeau rectangulaire de la couche épidermique du bulbe de l'Oignon (*Allium Cepa*), placé sur lame de quartz (dont le bord est visible) dans l'ultra-violet éloigné, de λ 248 m μ à λ 226. Pose 5 heures.
-



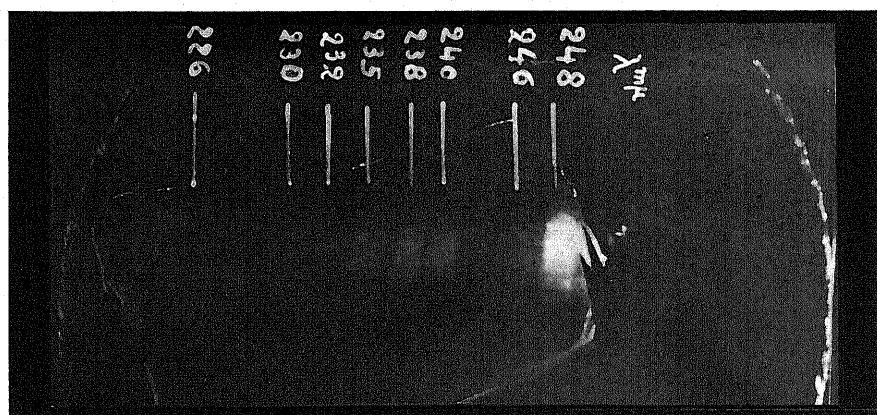
Excelsine

1



Sérum

2



Epiderme *Allium Cepa*

3

VIès: Sur le spectre d'excitation de la fluorescence des protides etc.

Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother Cells in *Hosta Sieboldiana* Engl.

By

Noboru Takamine

The spiral structure of meiotic chromosomes in *Hosta* has been observed by INARIYAMA (1928), SHINKE (1930) and ISHII (1931). In the present investigation, observations were made in stages from the metaphase of the heterotype division to the telophase of the homotype division, with special reference to these points: 1) the behaviour of chromosomes in the interkinesis and 2) the difference in structure between chromosomes in the heterotype and the homotype division.

Preparations were made generally with the aceto-carmin smear method, but in some cases, for a clearer demonstration of the chromosome structure, ÔURA's improved method of chromosome unravelling with certain alkaline solutions was employed. In the present investigation KCN solutions (2^{-4} to 2^{-9} mol) which were originally used by ÔURA (1936), and also NaHCO_3 solutions (2^{-4} to 2^{-9} mol), were used before staining with aceto-carmin. Of these solutions a 2^{-8} mol NaHCO_3 solution was found to be the best for the present material.

Observation

Heterotype metaphase. In this stage the spiral structure of the chromosome is observed. The chromosomes are found to be composed of two elements: a less stainable core and a chromatic spiral which winds around the core (Figs. 1, 2 and 3). Generally the spiral appears to be single, but in certain favorable cases, especially in those where the material is treated with the solution of 2^{-8} mol NaHCO_3 , its double nature is recognizable. In Figs. 2 and 3, Pl. 6 in which the chromosomes in the heterotype metaphase are shown, the double coiled structure which was first observed by FUJII (1926), can be seen in some of the chromosomes, especially those indicated by arrows.

Heterotype anaphase and telophase. In anaphase the chromosomes are elongated to a considerable extent being pulled toward the poles (Fig. 4), and the spirals are drawn out correspondingly. When the chromosomes reach the poles, they become shortened and the double-coiled structure is observable (Fig. 5). In the late telophase (Fig. 6) the regular major spirals are no longer recognizable, they being extensively drawn out, while the minor spirals still keep their regular form though the spiral winding is rendered more or less loose.

Interkinesis. In the interkinesis the minor spirals are found somewhat loosened and some of them take even the form of zig-zag threads, but as a whole the spiral structure is kept and individual spirals can be clearly distinguished from one another (Fig. 7). In no nucleus is presented the fine reticulate or anastomotic appearance such as that observed in the interkinesis in *Tradescantia reflexa*.

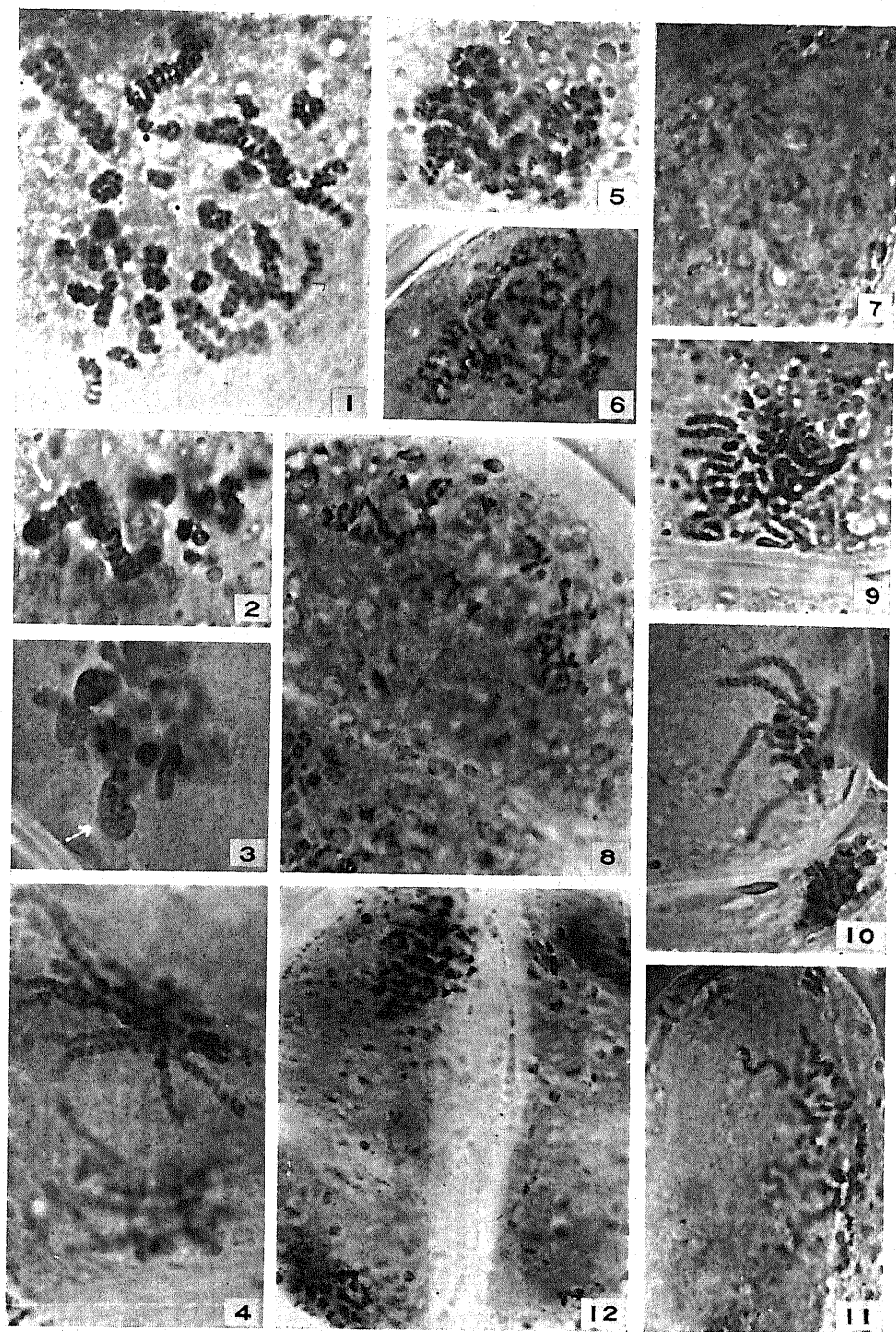
Homotype prophase to telophase. In the early prophase, the single coiled, ordinary spirals are clearly visible (Fig. 8). In the metaphase, the chromosomes in which the ordinary, single coiled spirals are found, are considerably thinner than those in the heterotype division. The chromosomes in anaphase of the homotype division are also thinner than those of the heterotype division. The spiral structure is also observed in the anaphase (Fig. 10) and telophase (Figs. 11, 12), but in this division the spirals are single coiled throughout the division.

Conclusion

From the results obtained in the present investigation we may conclude as follows: In *Hosta* the chromosomes in the heterotype division in pollen mother cells are of the double-coiled structure. In the telophase the major spirals begin to be unravelled and in the interkinesis they are no longer visible, while the minor spirals exist even in the interkinesis. In the second division the chromosomes are found to be of the single coiled structure in all the stages from prophase to telophase. They appear correspondingly thinner than those in the heterotype division.

The behaviour of chromonemata in the interkinesis very much resembles that of the chromonemata in *Lilium* studied by KATO and IWATA (1935), and IWATA (1935), but presents a marked contrast to the case of *Tradescantia* in which the minor spirals too undergo a remarkable change in the coiling manner (KATO, 1935). In *Sagittaria* studied by SHINKE (1934), on the other hand, the major spirals remain in the interkinesis without undergoing much alteration in the coiling manner. The cases of *Hosta* and *Lilium* may therefore be regarded as assuming an intermediate position between *Tradescantia* and *Sagittaria* in regard to the behaviour of chromonemata in the interkinesis.

The question remains not directly determined whether the spirals found in the homotype division are identical with the minor spirals in the heterotype division or not, owing to the lack of the observation in detail of the homotype prophase, but it seems probable that they are identical, because of the fact that no unravelling of the minor spirals takes place in the interkinesis. The fact that in *Sagittaria* no change has been observed in the coiling manner during the period



Takamine: Spiral Structure of Chromosomes in Pollen Mother Cells in
Hosta Sieboldiana Engl.

between the heterotype metaphase and the homotype metaphase (SHINKE, 1930) seems to favour the view.

Summary

1. By the smear method of preparation the doubly coiled spiral structure was ascertained in the metaphasic and telophasic chromosomes in the heterotype division.

2. During the progress from the heterotype telophase to the interkinesis, the spirals of larger gyres or the major spirals were unravelled, and in the interkinesis only the spirals of small gyres or the minor spirals were observed.

3. In the homotype division, the chromosomes were of the single coiled spiral structure throughout the division.

Literature Cited

- Fujii, K. (1926) Recent Progress in Cytology and its Method of Investigation. (Japanese). Report of Japan. Assoc. Adv. Sci., vol. 2.
- Inariyama, S. (1928) On the Spiral Structure of Chromosomes in *Hosta Sieboldiana*, ENGL. (Japanese). Bot. Mag. (Tokyo), vol. 42, No. 502.
- Ishii, T. (1931) On the Structure of Chromosomes. (Japanese). Jap. Jour. Genet., vol. 7, No. 3.
- Iwata, J. (1935) Chromosome Structure in *Lilium*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B, vol. 10, No. 4.
- Kato, K. (1935) Chromosome Behaviour in the Interkinesis, I. Observation of Pollen Mother Cells in *Tradescantia reflexa*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B, vol. 10, No. 4.
- and Iwata, J. (1935) Spiral Structure of Chromosomes in *Lilium*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B, vol. 10, No. 4.
- Ôura, G. (1936) A New Method of Unravelling the Chromonema Spirals. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie, Bd. 53.
- Shinke, N. (1930) On the Spiral Structure of Chromosomes in Some Higher Plants. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B, vol. 5.
- (1934) Spiral Structure of Chromosomes in Meiosis in *Sagittaria Aginashii*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B, vol. 9, No. 5.

Explanation of Plate 6

All figures are photomicrographs taken from aceto-carmine preparations, using ZEISS apochrom. imm. obj. 1.5 mm and Comp. oc. 8. The chromosomes shown in Figs. 1. 2. 4. 5. 9. 10 are treated with a 2-^s mol NaHCO₃ solution before staining. The others are stained without the treatment.

Figs. 1-3. Metaphase-I. Double coiled structure of chromosomes is visible, especially at the regions indicated by arrows.

Fig. 4. Anaphase-I.

Fig. 5. Telophase-I. Double coiled structure is shown at the region indicated by an arrow.

Fig. 6. A later telophase-I.

Fig. 7. Interkinesis. Minor spirals are shown.

Fig. 8. Prophase-II. Single coiled spirals are shown.

Fig. 9. Metaphase-II.

Fig. 10. Anaphase-II in side view showing thinner chromosomes of the ordinary, single coiled spiral structure.

Figs. 11, 12. Telophase-II. The ordinary spiral structure is shown.

Die Halligenflora der Nordsee im Lichte cytologischer Forschung

Von

G. Tischler

Der japanische Forscher SHIMOTOMAI (1933) beobachtete bei einem karyologischen Studium der Gattung *Chrysanthemum*, daß die wildwachsenden Arten mit den höchsten Chromosomensätzen nur an der Meeresküste auf salzigem oder sandigem Boden wuchsen. Ich habe daraufhin einmal die Gesamtflora gewisser kleiner Inseln an der Westküste Schleswig-Holsteins auf den Grad ihrer Polyploidie hin untersucht und vor nicht langer Zeit (1934, p. 34) eine vorläufige Mitteilung darüber veröffentlicht. Doch fehlten damals eine ganze Anzahl von Untersuchungen, so daß die errechneten Prozentzahlen keine endgültigen sein konnten. Im Vorjahr habe ich dann, als die noch ausstehenden Lücken nahezu vollständig ergänzt waren, auf dem Internationalen Botanikercongreß einen Vortrag über diese Probleme gehalten. Ein Résumé davon (1935) wurde in den Congreßberichten II, p. 54–56, gegeben. Jetzt sei es mir gestattet, in einem Aufsatz zu Ehren des hochverdienten Altmeisters japanischer Cytologie, der in seinem langen wissenschaftlichen Leben in Wort und Schrift so viele neue cytologische Anregungen uns geschenkt hat, ausführlichen Bericht zu erstatten.

Bei den Halligen handelt es sich um eine Gruppe kleiner Inseln, die bis vor nicht langer Zeit völlig ungeschützt den Fluten des Meeres gegenüberlagen. Bei Sturmfluten konnte unter Umständen die gesamte Grasdecke unter Wasser kommen, und nur die Häuser der Einwohner und ihre unmittelbare Umgebung, die sogenannten „Warften“, die auf kleinen Anhöhen liegen, ragten dann aus dem Wasser hervor. Das mußte eine scharfe Auswahl in der Florenzusammensetzung bedingen, da ja alle gegen die Meeressalze empfindlichen Pflanzen diese Überflutungen nicht ertragen konnten. Zwar ist jetzt an den meisten Stellen durch energisches Eingreifen des Menschen dieser Zustand im allgemeinen beseitigt. Aber unter außergewöhnlichen Umständen können trotzdem noch ähnliche Flutkatastrophen für die Inseln eintreten. Jedenfalls haben wir hier die Gelegenheit, an einer zahlenmäßig sehr beschränkten Flora festzustellen, ob und wie sich bei diesem Ausleseproceß die Zusammensetzung der Flora gegenüber dem stets geschützten Festlande geändert hat und insbesondere, ob der Prozentsatz an Polyploiden im Sinne von SHIMOTOMAI gewachsen ist.

Bereits in den bisherigen Mitteilungen führte ich aus, daß man die Gesamtflora der Halligen in einzelne ökologisch recht verschiedene

Gruppen sondern müße, wie dies bereits CHRISTIANSEN (1926) in seiner pflanzengeographischen Studie über die Halligen näher ausführte. Natürlich lassen sich die Grenzen nicht absolut scharf ziehen, und ich selbst habe mehrfache kleine Umgruppierungen im Laufe meiner Studien versucht. Es scheint mir jetzt am richtigsten, in folgender Weise zu gruppieren: 1) die eigentliche Halophytenflora, 2) die nichthalophile Sandflora, 3) die urwüchsige Graslandflora, 4) die Flora der Teiche und ihrer Ufer, 5) die völlig eingebürgerte Vegetation außerhalb des Graslandes, endlich 6) die nicht völlig eingebürgerte „spontane“ Flora. Während die fünf ersten Gruppen die charakteristische Insellflora ausmachen, die jedenfalls auch bei Verschwinden des Menschen bestehen bleiben würde, handelt es sich bei der letzten Gruppe um „Unkräuter“, die ohne den Menschen zum größten Teil wieder verschwinden würden und die z.T. auch bereits wieder verschwunden sind. Mit anderen Worten, es sind Pflanzen, die sich gegenüber der Umwelt nicht durchsetzen konnten.

Genauere Florenlisten über die Halligenflora verdanken wir CHRISTIANSEN (1926), der im ganzen das Vorkommen von 132 Angiospermen feststellte. Einige konnte er freilich davon nur mit Citaten aus der Literatur belegen. Ich kann dazu noch die im letzten Sommer auf der Insel „Hallig Hooge“ von mir aufgefundene *Lemna gibba* als neu hinzufügen.

Die eigentlichen „Halophyten“ bilden keine äußerlich abgegrenzte Zone, sondern sie wachsen meist zusammen mit den Pflanzen des „Graslandes“. Auch dürfen wir an der Nordsee unbedenklich eine Reihe von Arten als halophyt auffassen, die es anderswo nicht sind. Genaueres Studium der „Ökotypen“ müßte erst einsetzen, um festzustellen, wie weit es sich dabei um erblich verschiedene Rassen handelt. Jedenfalls können *Erythraea pulchella*, *Odontites rubra*, *Plantago maritima* und *Scirpus maritimus* anderswo ohne Salz gedeihen. *Matricaria inodora*, die ich bisher anders gruppierte, möchte ich jetzt im Lichte der Untersuchungen von HÜSER (1930) mit den Halophyten zusammenfassen. Dafür spricht außer dem unmittelbaren Vorkommen neben unzweifelhaften Halophyten wie *Cakile*, *Artemisia*, *Salsola*, *Honckenya* vor allem der anatomische Bau der Blätter mit ihrer starken „Sukkulenz“. Hier dürfte die Erbllichkeit der „Salzformen“ um so eher feststehen, als nach HÜSER auch die Chromosomen, zwar nicht in ihrer Zahl, aber wohl in ihrer viel größeren Gestalt gegenüber der bekannten „Ackerform“ sich unterscheiden.

Zu Beginn meiner Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Chromosomenzahlen von einem beträchtlichen Teil der in Frage kommenden Pflanzen noch nicht bekannt waren. Mein Assistent

Herr Dr. WULFF unternahm es auf meinen Rat, die Gesamthalophyten Deutschlands cytologisch zu bearbeiten, und er wird an anderer Stelle ausführlich darüber berichten. Auch von den chromosomal unbekannten Pflanzen der anderen Gruppen fertigte er für mich entsprechende Präparate an, die wir dann gemeinsam auf die Chromosomenzahlen studierten. Im nachfolgenden sind stets die neuaufgefundenen Zahlen durch ein vorgesetztes ! gekennzeichnet. Die Autoren für die übrigen Zahlen findet man in meinen Zusammenstellungen für die „Tabulae Biologicae“ (TISCHLER 1927, 1931, 1936).

1) Die eigentliche „Halophytenflora“:

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Agropyrum junceum</i>	14		+	! 20. <i>Obione pedunculata</i>	9	+	
2. <i>A. pungens</i>	21		+	! 21. <i>O. portulacoides</i>	18		+
3. <i>Armeria maritima</i>	7 ¹⁾	+		22. <i>Odontites rubra</i>	10	+	
4. <i>Artemisia maritima</i>	9	+		23. <i>Plantago coronopus</i>	5	+	
5. <i>Aster tripolium</i>	9	+		24. <i>Pl. maritima</i>	6	+	
6. <i>Atriplex litorale</i>	9	+		! 25. <i>Sagina maritima</i>	11-12	+	
7. <i>Cakile maritima</i>	9	+		! 26. <i>Salicornia herbacea</i>	19		+
8. <i>Carex distans</i>	37		+	! 27. <i>Salsola kali</i>	18		+
9. <i>Cochlearia danica</i>	21		+	28. <i>Scirpus maritimus</i>	ca. 52		+
10. <i>C. officinalis</i>	14		+	! 29. <i>Spergularia marginata</i>	9	+	
! 11. <i>Erythraea pulchella</i>	ca. 19		+	30. <i>S. salina</i>	18		+
12. <i>Festuca distans</i>	14		+	! 31. <i>Statice limonium</i>	18		+
! 13. <i>F. thalassica</i>	ca. 35		+	! 32. <i>Suaeda maritima</i>	18		+
! 14. <i>Glaux maritima</i>	15		+	33. <i>Trifolium fragiferum</i>	8	+	
15. <i>Honckenya peploides</i>	24		+	34. <i>Triglochin maritimum</i>	24		+
! 16. <i>Juncus Gerardi</i>	40		+	35. <i>Zostera marina</i>	6	+	
17. <i>Kochia hirsuta</i>	9	+		! 36. <i>Z. nana</i>	6	+	
18. <i>Lepturus incurvatus</i>	18		+				
19. <i>Matricaria inodora</i>	9	+				16	20

Σ Polyploiden = 55,6%

2) Die nichthalophile Sandflora:

Sie ist auf den Halligen nur in sehr geringem Maße ausgebildet. Die Gründe findet man bei CHRISTIANSEN (1926, p. 244) erörtert.

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Carex arenaria</i>	ca. 32		+	4. <i>Hordeum secalinum</i>	14		+
2. <i>Elymus arenarius</i>	28		+	! 5. <i>Psamma arenaria</i>	14		+
3. <i>Galium verum</i>	22		+	! 6. <i>Sedum acre</i>	24 ²⁾		+
						0	6

Σ Polyploiden = 100%

Anm. 1) Die Angabe n = 10 für *Armeria vulgaris*, die SUGIURA (1936) bringt, ist mir bis auf weiteres noch nicht gesichert. Handelt es sich vielleicht bei ihm um triploide Individuen?

Anm. 2) Die cytologischen Verhältnisse bei *Sedum acre* sind noch nicht ganz klar, da für die Meiosis die Möglichkeit zu bestehen scheint, daß infolge „secondary association“ die Zahl der „Einheiten“ kleiner aussieht, als sie wirklich ist. Neuerdings zählte Toyohuku (1935) bei einer englischen Rasse n = 8.

3) Die urwüchsige Graslandflora:

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Agropyrum repens</i>	21		+	! 10. <i>Juncus bufonius</i>	20-30		+
2. <i>Agrostis alba</i>	21, 28		+	11. <i>Leontodon</i>			
! 3. <i>Alectorolophus</i>				<i>autumnale</i>	6	+	
<i>major</i>	7 ¹⁾	+		12. <i>Lotus corniculatus</i>	6	+	
4. <i>Alopecurus</i>				13. <i>Ononis spinosa</i>	16 ²⁾	+	
<i>geniculatus</i>	14		+	14. <i>Poa trivialis</i>	7	+	
5. <i>Carum carvi</i>	10, 11	+		15. <i>Potentilla anserina</i>	14		+
! 6. <i>Cerastium triviale</i>	(54), 72		+	! 16. <i>Sagina nodosa</i>	10-12	+	
7. <i>Festuca rubra</i>	21, 28		+	! 17. <i>S. procumbens</i>	11	+	
8. <i>Holcus lanatus</i>	7	+		18. <i>Trifolium minus</i>	14-16		+
9. <i>Hypochoeris</i>				19. <i>T. repens</i>	16		+
<i>radicata</i>	4	+					
					10		9
					(9) ³⁾		(10) ³⁾

Σ Polyploiden = 47,4% (resp. 52,6%³⁾)

4) Die Flora der Teiche und ihrer Ufer:

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Batrachium</i>				3. <i>Phragmites</i>			
<i>Baudotii</i> ⁴⁾	16		+	<i>communis</i>	24		+
2. <i>Lemna gibba</i>	32		+	4. <i>Rumex</i>			
				<i>hydrolapathum</i>	100		+
					0		4

Σ Polyploiden = 100%

5) Die völlig eingebürgerte Vegetation außerhalb des Graslandes:

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Achillea millefolium</i>	>24		+	10. <i>Poa pratensis</i> ⁵⁾	28		+
2. <i>Aegopodium</i>				11. <i>Polygonum</i>			
<i>podagraria</i>	22		+	<i>aviculare</i>	20		+
3. <i>Atriplex hastatum</i>	9	+		12. <i>Ranunculus</i>			
4. <i>Coronopus Ruellii</i>	16		+	<i>repens</i>	14		+
5. <i>Hordeum murinum</i>	14		+	! 13. <i>Sonchus arvensis</i>	>30		+
6. <i>Lepidium rudemale</i>	16		+	14. <i>Stellaria media</i>	20-22		+
7. <i>Lolium perenne</i>	7	+		15. <i>Taraxacum</i>			
8. <i>Phleum pratense</i>	21		+	<i>officinale</i>	12		+
9. <i>Poa annua</i>	14		+		2		13

Σ Polyploiden = 86,7%

Anm. 1) Auch aus den neuesten Untersuchungen von FAGERLIND (1936), die der Autor ja selbst mit aller Reserve veröffentlicht, geht mir noch nicht klar hervor, daß die Zahl 7 durch die Zahl 11 zu ersetzen ist. Die 4 „punktförmigen Körperchen“ sind vielleicht, wie FAGERLIND auch andeutet, Fragmente.

Anm. 2) Ich habe vorläufig *Ononis spinosa* als diploid bewertet, trotzdem manche Verwandte die Chromosomenzahl 8 aufweisen. Ich tue es, weil bisher bei 10 untersuchten *Ononis*-Arten keine mit 8, dagegen 9 mit 16 und 1 mit 32 Chromosomen gefunden wurden (TISCHLER 1936).

Anm. 3) Die eingeklammerten Zahlen gelten für den Fall, daß *Ononis spinosa* als polyploid zu werten ist.

Anm. 4) Es ist nicht absolut gesichert, ob in den von CHRISTIANSEN und später auch von mir auf Hallig Hooe aufgefundenen Individuen diese Art oder eine Rasse von *Batrachium aquatile* vorliegt. Polyploid ist sie in jedem Fall.

Anm. 5) CHRISTIANSEN (1926) führt ausdrücklich *Poa trivialis* allein für das Grasland als charakteristisch an, *Poa pratensis* dagegen zusammen mit *Poa trivialis* auch für die Unkräuter der „Warften“.

Fassen wir unsere Resultate für die eigentliche völlig eingebürgerte Halligflora in bezug auf die Polyploidie ihrer Einzelarten zusammen, so ergibt sich uns das folgende Bild:

	Gesamtartenzahl	Polyploide	in Procent
Gruppe 1	36	20	55,6
„ 2	6	6	100
„ 3	19	9	47,4
„ 4	4	4	100
„ 5	15	13	86,7

Das macht eine Gesamtzahl von 80 Species, von denen 52, also 65%, polyploid sind. Vergleichen wir diese Zahl mit der der Polyploiden von ganz Schleswig-Holstein (z.Zt. = 45,8%), so ergibt sich, daß auch unter Berücksichtigung der mittleren Fehler eine reale Differenz existiert. Freilich ist bei der Einsetzung der Polyploiden der Gesamtflora zu berücksichtigen, daß hier erst 779 von 1074 Arten (72,5%) chromosomal untersucht sind. Der Mittelwert und sein mittlerer Fehler würden hier also betragen:

$$M_1 = 45,8 \pm \sqrt{\frac{45,8 \cdot 54,2}{779}} = 45,8 \pm 1,8$$

Demgegenüber ist der mittlere Fehler bei der relativ kleinen Zahl der Halligpflanzen natürlich größer, nämlich:

$$M_2 = 65 \pm \sqrt{\frac{65 \cdot 35}{80}} = 65 \pm 5,3,$$

und die Differenz beider Werte, $19,2 \pm 5,6$, ist noch größer als der dreifache mittlere Fehler. Der Grad der Polyploidie der Halligpflanzen ist also, unbeschadet der relativ hohen Zahl von Diploiden, die an das salzige Wasser angepaßt sind, doch noch gerade im Sinne von SHIMOTOMAI auszuwerten. Es wäre aber anzustreben, durch genauere Analyse festzustellen, wieviel Procent des Bodenareals von den Diploiden und wieviel von den Polyploiden besiedelt sind. Wenn man im Juni über das Halligengrasland wandert, so erscheint auf den ersten Blick die Flora durch zwei Diploide, nämlich *Armeria maritima* und *Alectorolophus major*, bestimmt, die die Inseln in einen roten und gelben Blütenteppich zu verwandeln scheinen. Solche Schätzungen sind selbstverständlich so subjektiv beeinflußt, daß sie nicht ernstlich zu diskutieren sind.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei den verhältnismäßig zahlreichen „spontanen“ Arten, d.h. solchen, die wir als wirkliche Bürger der Halligenflora nach CHRISTIANSEN nicht rechnen dürfen. Nach der Liste dieses Autors handelt es sich um folgende Arten:

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Aethusa cynapium</i>	11	+		27. <i>Malva neglecta</i>	21		+
! 2. <i>Anagallis</i>				28. <i>Matricaria</i>			
<i>arvensis</i>	20		+	<i>chamomilla</i>	9	+	
3. <i>Anthoxanthum</i>				! 29. <i>M. discoidea</i>	9	+	
<i>aristatum</i>	5	+		30. <i>Petasites officinalis</i>	30		+
4. <i>Apera spica venti</i>	7	+		31. <i>Plantago</i>			
! 5. <i>Arctium minus</i>	ca. 18		+	<i>lanceolata</i>	6	+	
6. <i>Bellis perennis</i>	9	+		32. <i>P. major</i>	6	+	
7. <i>Bromus arvensis</i>	7	+		33. <i>P. media</i>	12		+
8. <i>B. mollis</i>	14		+	34. <i>Ranunculus acer</i>	7	+	
9. <i>Calystegia sepium</i>	11	+		35. <i>R. bulbosus</i>	8	+	
10. <i>Capsella bursa</i>				36. <i>Rumex crispus</i>	30		+
<i>pastoris</i>	16		+	37. <i>Secale cereale</i>	7	+	
11. <i>Centaurea cyanus</i>	12	+		38. <i>Senecio vulgaris</i>	20		+
12. <i>Cirsium arvense</i>	17	+		39. <i>Sinapis arvensis</i>	9	+	
13. <i>C. lanceolatum</i>	34		+	! 40. <i>Sisymbrium</i>			
14. <i>Conium</i>				<i>officinale</i>	7	+	
<i>maculatum</i>	11	+		41. <i>Sonchus oleraceus</i>	8	+	
15. <i>Cynosurus</i>				42. <i>Stellaria graminea</i>	13	+	
<i>cristatus</i>	7	+		43. <i>Thlaspi arvense</i>	7	+	
16. <i>Dactylis glomerata</i>	14		+	44. <i>Trifolium</i>			
17. <i>Euphorbia</i>				<i>hybridum</i>	8	+	
<i>helioscopia</i>	21		+	45. <i>T. pratense</i>	7	+	
! 18. <i>E. peplus</i>	8	+		46. <i>Urtica dioica</i>	24		+
19. <i>Festuca elatior</i>	7	+		47. <i>U. urens</i>	12	+	
! 20. <i>Fumaria</i>				! 48. <i>Veronica agrestis</i>	14		+
<i>officinalis</i> ¹⁾	14		+	49. <i>Vicia cracca</i> ²⁾	14		+
21. <i>Galium aparine</i>	33, 44		+	50. <i>V. hirsuta</i>	7	+	
22. <i>Helianthus annuus</i>	17	+		51. <i>V. sativa</i>	6	+	
23. <i>Hyoscyamus niger</i>	17	+		52. <i>Viola odorata</i>	10	+	
24. <i>Lamium</i>				53. <i>V. arvensis</i>	17		+
<i>amplexicaule</i>	9	+					
25. <i>L. purpureum</i>	9	+					
26. <i>Lathyrus</i>							
<i>pratensis</i>	7	+					
					35		18

Σ Polyptoiden = 33,9%

Der Unterschied dieser 53 „nichteingebürgerten“ Pflanzen gegenüber den wirklich einheimisch gewordenen 80 ist so groß, daß er als realer zu werten ist. Der mittlere Fehler bei der Berechnung des Prozentsatzes von 33,9 stellt sich auf:

$$M_s = \pm \sqrt{\frac{33,9 \cdot 66,1}{53}} = \pm 6,5,$$

und bei Berücksichtigung der vorhin angegebenen Zahl $M_2 = \pm 5,3$ die Differenz der Mittelwerte = $31,1 \pm 8,4$, einen deutlich positiven Wert, größer als den, den wir bei Vergleich der Halligenflora und der des Gesamtlandes erhielten.

Sicherlich sind dabei zur Zeit durchaus nicht alle dieser 53 Spontanpflanzen auf den Halligen zu finden. So wurden von

Anm. 1) Inzwischen auch von NEGODI (1935, 1936), gefunden.

Anm. 2) Nach SWESCHNIKOWA (1928) sind bisher im Norden nur die tetraploiden Rassen gefunden worden. Die diploiden kommen anscheinend nur sehr selten in Europa vor. Ich selbst habe auf den Halligen niemals *Vicia cracca* angetroffen.

CHRISTIANSEN bei einer eigenen genauen Durchforschung nicht mehr aufgefunden die Diploiden *Conium maculatum*, *Hyoscyamus niger*, *Lathyrus pratensis*, *Plantago major*, *Ranunculus acer* und die Tetraploiden *Fumaria officinalis* und *Urtica dioica*. Da mehrere der Halligen jetzt durch Deiche mit dem Festland verbunden werden oder schon verbunden sind, ist anzunehmen, daß die Zahl dieser neueinwandernden Pflanzen in den nächsten Jahren rasch zunehmen wird.

Zum Schluß meiner Abhandlung sei die Flora einer kleinen und interessanten Hallig noch besonders hervorgehoben, nämlich die der Insel Norderoog. Sie ist als Vogelschutzgebiet in den letzten Jahren sehr bekannt geworden. Außer einem Aufseher, der dort während einiger Sommermonate in einer ziemlich primitiven Behausung wohnt, hat sich kein Mensch dort angesiedelt. Eine Zonengliederung auf dieser Insel ist, wie bereits CHRISTIANSEN hervorhebt, nicht aufrecht zu halten, da ein eigentliches Grasland nicht existiert. Bestandsaufnahmen wurden von CHRISTIANSEN am 27.6.25, von WULFF und mir am 14.6.36 gemacht. Es ergab sich im wesentlichen Übereinstimmung; nur haben wir einige der von CHRISTIANSEN aufgefundenen Unkräuter wie *Cerastium*, *Lotus*, *Potentilla*, *Sonchus*, aber auch *Rumex* und *Sedum* nicht angetroffen und *Cochlearia* sowie *Triglochin* der CHRISTIANSENSchen Liste zufügen können. Das Fehlen der ersteren kann indes auf Zufall beruhen, da wir wegen der zahlreichen Gelege der brütenden Vögel und der eben ausgeschlüpften Jungvögel nicht überall uns frei bewegen durften.

Im nachfolgenden sei noch diese Specialflora auf ihren Gehalt an Polyploiden untersucht:

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
1. <i>Agropyrum junceum</i>	14		+	16. <i>Honckenya peploides</i>	ca. 24		+
2. <i>A. pungens</i>	21		+	17. <i>Juncus Gerardi</i>	40		+
3. <i>Agrostis alba</i>	21, 28		+	18. <i>Lotus corniculatus</i>	6	+	
4. <i>Armeria maritima</i>	7	+		19. <i>Obione portulacoides</i> ¹⁾	18		+
5. <i>Artemisia maritima</i>	9	+		20. <i>Phragmites communis</i>	24		+
6. <i>Aster tripolium</i>	9	+		21. <i>Plantago maritima</i>	6	+	
7. <i>Atriplex hastatum</i>	9	+		22. <i>Polygonum aviculare</i>	20		+
8. <i>A. litorale</i>	9	+		23. <i>Potentilla anserina</i>	14		+
9. <i>Cakile maritima</i>	9	+		24. <i>Psamma arenaria</i>	14		+
10. <i>Cerastium triviale</i>	(54), 72		+	25. <i>Rumex hydrolapathum</i>	100		+
11. <i>Cochlearia spec.</i>	14, 21		+	26. <i>Salicornia herbacea</i>	19		+
12. <i>Elymus arenarius</i>	28		+				
13. <i>Festuca distans</i>	14		+				
14. <i>F. rubra</i>	21, 28		+				
15. <i>Glaux maritima</i>	15		+				

Anm. 1) Es ist von Interesse, daß nur die perennierende tetraploide, nicht die annuelle diploide Art (*O. pedunculata*) sich eingefunden hat (vgl. MÜNTZING 1936, p. 340 ff.).

	n	di- ploid	poly- ploid		n	di- ploid	poly- ploid
27. <i>Sedum acre</i> ¹⁾	24		+	32. <i>Suaeda maritima</i>	18		+
28. <i>Sonchus arvensis</i>	>30		+	33. <i>Triglochin</i>			
29. <i>Spergularia</i>				<i>maritima</i>	24		+
<i>marginata</i>	9	+		34. <i>Zostera marina</i>	6	+	
30. <i>S. salina</i>	18		+	35. <i>Z. nana</i>	6	+	
31. <i>Statice limonium</i>	18		+				
						12	23

Σ Polyploiden = 65,7%

Der mittlere Fehler M_4 berechnet sich auf $\pm \sqrt{\frac{65,7 \cdot 34,3}{35}} = \pm 8,02$, also $65,7 \pm 8$. Vergleichen wir diese Werte mit denen, die wir für die Polyploiden der Gesamthalligen fanden ($65 \pm 5,3$), so ergibt sich zufällig eine sehr weitgehende Übereinstimmung.

Es würde von großem Interesse sein, ähnliche Inselgebiete, die in subtropischen oder tropischen Zonen liegen, mit den unsrigen zu vergleichen. Dann ließe sich feststellen, ob für unsere „Halligen“ auch der „Nordfaktor“ (TISCHLER 1934, 1935) neben den durch das Milieu bedingten edaphischen Faktoren eine nennenswerte Rolle bei der Selektion der Polyploiden gespielt hat.

Zusammenfassung

1. Der Gehalt der Polyploiden unter den eingebürgerten „Halligen“pflanzen hat gegenüber dem der Gesamtflora des benachbarten Landes eine leichte Steigerung erfahren. An dieser nehmen die verschiedenen ökologischen Gruppen in ungleichem Maße teil. Am meisten Diploide haben die Pflanzen der „Graslandschaft“, wobei die Halophyten und Nichthalophyten sich nicht sehr unterscheiden. Wesentlich mehr Polyploide haben aber die völlig eingebürgerten, ursprünglich durch den Menschen eingeführten Unkräuter. Die Vertreter der spärlichen Sandflora sowie die der Gewässer- und Uferflora sind durchweg polyploid.

2. Im starken Gegensatz dazu enthalten die „nicht wirklich eingebürgerten“ Pflanzen einen Gehalt an Polyploiden, der unter dem der Gesamtflora ist.

3. Daraus darf wohl geschlossen werden, daß bei Neueinführungen von Arten der Faktor der Polyploidie einen starken ökologischen Wert besitzt.

4. Die anhangsweise gegebene Analyse der Lokalfloora einer besonders kleinen Insel, die von menschlichen Eingriffen möglichst verschont geblieben ist, ergab einen Polyploiden-Gehalt, der ungefähr mit dem der Gesamthalligen übereinstimmt.

Kiel, Botanisches Institut der Universität,
z. Zt. Losgehnen (Ostpreußen),
7. 9. 1936

Citierte Literatur

- Christiansen, W. 1926. Schriften Naturw. Ver. Schleswig-Holstein Bd. 17, p. 243 ff.
Fagerlind, F. 1936. Hereditas Bd. 22, p. 189 ff.
Hüser, W. 1930. Planta Bd. 11, p. 485 ff.
Müntzing, A. 1936. Hereditas Bd. 21, p. 263 ff.
Negodi, G. 1935. Atti Soc. Natur. e Matem. di Modena Vol. 67, 3 pp.
——— 1936. Rivista di Biologia Vol. 20, 15 pp.
Shimotomai, N. 1933. Journ. Scienc. Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 2 Vol. 2, p. 1 ff.
Sugiura, T. 1936. Proceed. Imp. Acad. Tokyo Vol. 12, p. 144 ff.
Sweschnikowa, I. 1928. Verhandl. V. Internat. Kongr. Vererbungswissensch.
Berlin Bd. 2, p. 1415 ff.
Tischler, G. 1927. Tabul. Biolog. Bd. 4, p. 1 ff.
——— 1931. Tabul. Biolog. Bd. 7, p. 109 ff.
——— 1934. Englers Botan. Jahrb. 67, p. 1 ff.
——— 1935. Proceed. VI. Internat. Botan. Congr. Amsterdam Vol. 2, p. 54 ff.
——— 1936. Tabul. Biolog. Bd. 12, p. 57 ff.
Toyohuku, T. 1935. Japan. Journ. of Genet. Vol. 11, p. 316 ff.
-

Chromosome Numbers in the Polemoniaceae

By

Walter S. Flory

Division of Horticulture, Texas Agricultural Experiment Station

This family is divided by systematists into two subfamilies. Cobaeoideae is composed of the genera *Cantua*, *Huthia*, and *Cobaea* which are tall shrubs, trees, or vines. The approximately fourteen other (herbaceous or low shrubby) genera comprise the subfamily Polemonioideae. From the standpoint of number of included species the most important of these latter genera are *Gilia*, *Phlox*, *Polemonium*, and *Collomia*. The genera *Phlox* and *Polemonium* are each quite distinct and their species are seldom confused with those of other genera, but the remaining twelve genera of this subfamily apparently do not have taxonomic boundaries of equivalent distinctness. Certain species have been placed in one genus by one author, and in one or more different genera by others. The genus *Gilia* has been extended by some writers to include practically all species of the Polemonioideae outside of the genera *Phlox* and *Polemonium*. This was first pointed out to me by Professor Edgar T. Wherry who is making a taxonomic and geographic study of the Polemoniaceae, and was increasingly emphasized as literature sources and herbarium specimens were consulted and examined.

It has been the purpose of the work herein presented to secure data on all obtainable polemoniaceous species with respect to chromosome numbers, size, and general morphology. Especial attention has been given to securing information of significance from a taxonomic standpoint. Since several factors combine to make the immediate completion of the original program impossible it seems desirable, meanwhile, to present the accumulated data, together with suggested conclusions.

Representatives of nine genera have been available for this study. The genera *Polemonium* and *Phlox*, as noted below, have been subjects of previous cytological work; chromosome counts in several species of these genera not covered by the previous surveys have been made and are included here. Brief reports of chromosome observations have previously been made on single species of three other genera of the family. These are indicated in table 1 by giving the name of the original author opposite the species involved.

Materials

Plants or seeds were obtained from botanists, professional collectors, seed houses, and in some cases by personal collections. The greatest proportion of the material was obtained as seed from commercial houses and, as was perhaps to be expected with plants in a taxonomically confused family, proved in many cases to have been assigned incorrect specific and even incorrect generic names. No material of uncertain identity at the time of its receipt is included in this report unless it was grown to the flowering stage and then checked. Pressed specimens on which the identity of the species concerned may be established have been kept.

Methods

Most of the material has been studied cytologically in smear preparations. Meiotic material has been prepared by Belling's (1926) iron-aceto-carmin method, or by modifications of this. Root tip material has been prepared by a modification of Warmke's (1935) root tip smear method.

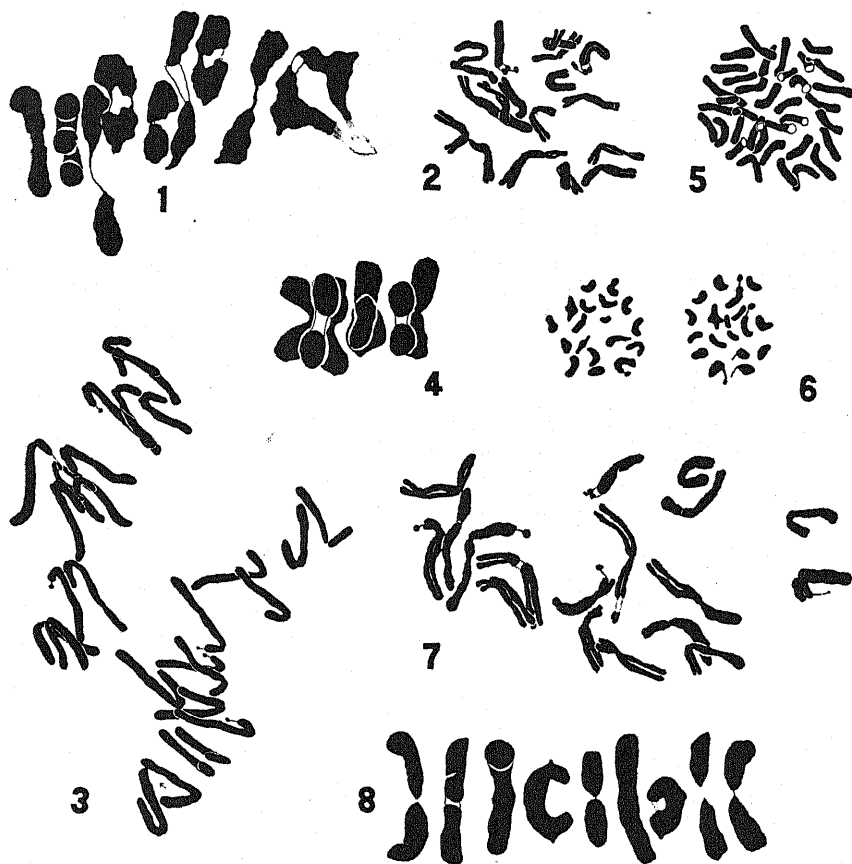
Some material was embedded in paraffin and sectioned. Zirkle's (1930) method of dehydrating tissues by use of n-butyl alcohol, in the higher series, works well with *Gilia* tissues. Johansen's (1935) tertiary butyl alcohol dehydration method gives excellent preparations; sections do not adhere to the slide as smoothly as with n-butyl alcohol, but the time from killing to staining is greatly shortened and cellular details are superb.

Drawings were made with the aid of an Abbe Camera-lucida. Original magnifications of these were approximately $\times 3400$ with three exceptions; Fig. 2 was drawn originally at about $\times 2400$, and Figs. 3 and 4 were made at approximately $\times 3000$. All figures have been reduced one-half in reproduction.

Chromosome Numbers

This section summarizes chromosome counts in the Polemoniaceae as known from the present and past work of the writer and of other workers. Previously unreported counts in 40 different species or well differentiated varieties are given here. About 105 polemoniaceous lines were investigated in the present work; some of these were representatives of the same species secured from different sources; some were lines previously reported upon but were included here to clear up questionable points. The species studied fall into several cytological groups recognizable chiefly upon the basis

of chromosome numbers but also, to some extent, by general chromosome morphology.



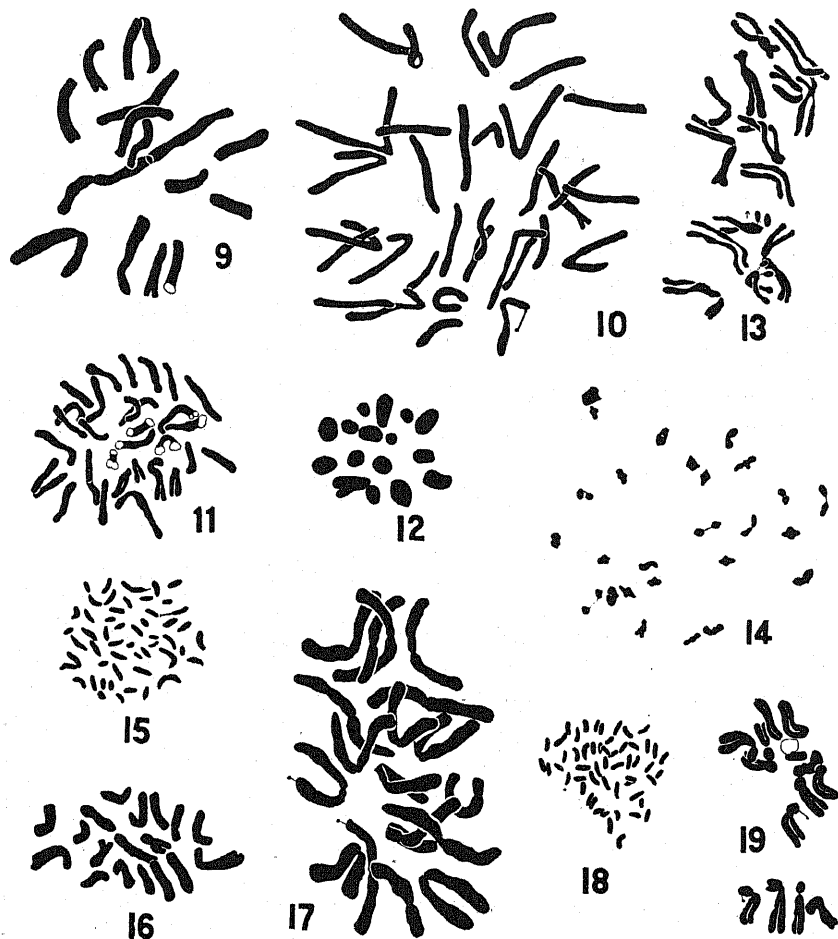
Figs. 1-8. Chromosomes in *Gilia* species. 1-4, 7, and 8 from aceto-carmin smears; 5 and 6 from paraffin embedded, sectioned, material. 1. *Gilia rigidula*; metaphase; $n = 9$. 2. *G. rigidula*; metaphase; $2n = 18$. 3. *G. (Ipomopsis) rubra*; anaphase; $2n = 14$. 4. *G. (Ipomopsis) rubra*; metaphase; $n = 7$. 5. *G. millefoliata*; metaphase; $2n = 36$. 6. *G. millefoliata*; II metaphase (complements on both spindles shown); $n = 18$. 7. *G. tricolor*; metaphase; $2n = 18$. 8. *G. tricolor*; metaphase; $n = 9$ (chromosomes separated in drawing).

In the genus *Phlox* 7 is the basic chromosome number for all forms examined both in this and previous studies. Most *Phlox* species are diploids. The exceptions found are low polyploids, three being tetraploids and one seemingly a triploid.

The present work has shown two basic numbers in plants commonly assigned to the genus *Gilia*. These are 7 and 9, the latter number being more frequent. One species of this genus, *G. millefoliata*, is apparently a tetraploid with 36 chromosomes (Figs. 5 and 6), although in an earlier, embryological, study Schnarf (1921) re-

ported 16 pairs of chromosomes in this species. Several genera often included in *Gilia* but probably deserving to be separated from that genus have basic numbers of either 7 or 9. These genera will be discussed in more detail below.

In *Polemonium* previous investigations (Clausen 1931) as well as the present work have revealed only diploid species with 9 pairs of chromosomes.



Figs. 9-19. Chromosomes in species from several genera of the Polemoniaceae. 9, 10, 13, 14, 16, and 17 from aceto-carmin smears; 11, 12, 15, 18, and 19 from paraffin embedded, sectioned, material. 9. *Collomia grandiflora*; metaphase; $2n = 16$. 10. *C. grandiflora*; metaphase; $2n = 32$; tetraploid cell in root tip of diploid plant. 11. *C. coccinea*; metaphase; $2n = 32$. 12. *C. coccinea*; metaphase; $n = 16$. 13. *Hugelia virgata*; metaphase; $2n = 14$. 14. *Cobaea scandens*; metaphase; $n = 26$. 15. *C. scandens*; metaphase; $2n = 52$. 16. *Linanthus dianthiflorus*; metaphase; $2n = 18$. 17. *Polemonium boreale*; metaphase; $2n = 18$. 18. *Cantua buxifolia*; metaphase; $2n = \text{ca. } 54$. 19. *Phlox nivalis*; metaphase; $2n = 14$.

The genus *Collomia* has a basic number of 8, three species having been found with 16 chromosomes, and a fourth possessing 32 somatic chromosomes. In this genus occasional tetraploid root tip cells have been found in diploid species (Fig. 10).

Cobaea has been represented by a single species in the present work. This was observed to have 26 pairs of chromosomes (Figs. 14 and 15). Lawson (1898) in studying the karyokinetic spindles in the P.M.C.'s of this species (*C. scandens*) says "The largest number (of chromosomes) observed in polar view was twelve." It is thus possible that there are both diploid and tetraploid forms of this species, the latter having been encountered in my work.

Cantua also has been represented by only one species here. The exact chromosome number has not yet been ascertained but there are approximately 54 in somatic nuclei (Fig. 18).

The above discussion shows that in the subfamily Polemonioidae there are three basic chromosome numbers, viz., 7, 8, and 9. In the other division of the family, Cobaeoideae, chromosome numbers are much higher with bases of 26, and, perhaps, 27 in the ones investigated.

Table 1 includes a complete list of available chromosome numbers of polemoniaceous plants with the exception of most of the species of *Phlox*, previously reported upon by the writer (Flory 1934). Numbers are given, however, for *P. buckleyi* and for *P. adsurgens*; for the former because they had not previously been observed in the P.M.C.'s of this interesting species; for the latter because the number for authentic material of this species differs from that of the horticultural form sold under that name which had been used in a previous study. The names given for the species worked with in the present study are the checked and corrected ones, which differ in a number of cases from those given at the source of the material. Numbers not reported initially in this paper are followed by the name of the original author.

Chromosome Size and Morphology

Chromosome size depends, to some extent, upon the fixative used. Acetic acid has a swelling effect upon chromatin; most of the acids commonly used in fixing prior to paraffin embedding are more likely to shrink chromatin. Hence in smear preparations the chromosomes of a species may be appreciably longer than in sections from the same species prepared by the paraffin method. For a reliable comparison of chromosome length all mounts upon which measurements have been made should be prepared in as nearly identical manners as possible. The somatic chromosome lengths recorded here have

Table 1. Chromosome numbers in the Polemoniaceae

Species	n	2n	Authors
Polemonioidae			
<i>Collomia coccinea</i> Lehm.	16	32	
<i>C. grandiflora</i> Dougl.	8	16	
<i>C. heterophylla</i> Hook		16	
<i>C. linearis</i>		16	
<i>Gilia achilleaefolia</i> Benth.	9	18	
<i>G. aggregata</i> (Pursh.) Spreng.	7	14	
<i>G. capitata</i> Dougl. ex Hook		18	Flory, 1934
<i>G. loniflora</i> (Torr.) G. Don		14	
<i>G. millefoliata</i> Fisch. & Mey.	16		Schnarf, 1921
<i>G. millefoliata</i> Fisch. & Mey.	18	36	
<i>G. rigidula</i> Benth.	9	18	
<i>G. rubra</i> (L.) Heller	7	14	
<i>G. tricolor</i> Benth.	9	18	
<i>G. tricolor nivalis</i> Hort.	9	18	
<i>Hugelia virgata</i> Benth.		14	
<i>Leptodactylon californicum</i> Hook. & Arn.		18	
<i>Linanthus aureus</i> Greene		18	
<i>L. densiflorus</i> Millik.		18	
<i>L. dianthiflorus</i> Greene		18	
<i>L. dichotomus</i> Benth.		18	
<i>L. parviflorus</i> Greene		18	
<i>Phlox adsurgens</i> Hort.		ca. 21	Flory, 1934
<i>P. adsurgens</i> Torr. ex Gray		14	
<i>P. amplifolia</i> Britton	7		
<i>P. bifida</i> Beck.		14	
<i>P. buckleyi</i> Wherry (P.M.C's)	14		
<i>P. Hoodii</i> Hort.		28	
<i>P. longiflora</i> Hort.		14	
<i>P. nivalis</i> Lodd.		14	
<i>P. paniculata</i> L. hort. vars.			
Ferdinand Cortez	7		
Terre Neuve	7		
Von Hochberg	7		
Widar	7		
<i>Polemonium boreale</i> Adams		18	
<i>P. caeruleum</i>	9	18	Clausen, 1931
<i>P. caeruleum album</i> Hort.		18	
<i>P. c. gracile</i> (Willd.) Brand		18	
<i>P. c. himalayianum</i> Baker	9	18	Clausen, 1931; present account
<i>P. c. monstrosus</i> Hort.		18	
<i>P. carneum</i> Gray	9	18	Clausen, 1931
<i>P. confertum</i> Gray	9		
<i>P. filicinum</i> Greene	9	18	Clausen, 1931; present account
<i>P. mexicanum</i> Cerv.	9	18	Clausen, 1931; present account
<i>P. molle</i> Greene		18	
<i>P. pauciflorum</i> Wats.	9	18	Clausen, 1931
<i>P. pulcherrimum</i> Hook	9	18	Clausen, 1931
<i>P. reptans</i> L.	9	18	Clausen, 1931; present account
<i>P. Richardsonii</i> Hort.	9	18	
<i>P. van Bruntiae</i> Britton		18	
Cobaeoideae			
<i>Cantua burxifolia</i> Juss. ex Lam.		ca. 54	
<i>Cobaea scandens</i> Cav.	ca. 12		Lawson, 1898
<i>C. scandens</i> Cav.	26	52	

all been secured from preparations made by the modified Warmke's method.

In Table 2 are indicated the size, approximate point of spindle fiber attachment, and number of satellites observed, of chromosomes of species representing the different cytological groups encountered. In material from some species, especially those with small chromosomes, the spindle fiber constrictions do not show clearly. Where no evidence of a constriction is seen in either smeared or sectioned preparations, the chromosome is said to have a terminal attachment point. There is a possibility that at least some of the chromosomes so designated may actually have attachments other than terminal.

Table 2. Data on somatic chromosomes of representative species in different cytological groups

representative	2n	length in microns		spindle fiber attachment point				no. of satellites observed
		shortest	longest	terminal (or nearly so)	sub-terminal	median	sub-median	
1. <i>Cobaea scandens</i>	52	1.	2.5	42	4	6		2+
2. <i>Collomia grandiflora</i>	16	3.5	9.	4	10		2	2
3. <i>Gilia achilleaeifolia</i>	18	4.5	9.		8	4-0	6-10	2
4. <i>Gilia (Ipomopsis) rubra</i>	14	7.5	10.		10		4	4
5. <i>Hugelia virgata</i>	14	5.	7.5		8	2	4	?
6. <i>Linanthus dianthiflorus</i>	18	2.	4.5	2	10		6	2+
7. <i>Phlox bifida</i>	14	5.	9.		10	4		2+
8. <i>Polemonium boreale</i>	18	7.	11.5		2	16		2+

Cytological Groups—Taxonomic Implications

Cobaea and *Cantua*, of the subfamily Cobaeoideae, have many more, and much smaller, chromosomes than have the genera in the Polemonoideae. Also the nuclear-cytoplasmic ratio is much larger here than in other genera of this family. No *Huthia* species have been available for study. If this genus, together with *Cobaea* and *Cantua* really form a natural subdivision of the Polemoniaceae, as is commonly suggested, we would also expect to find many small chromosomes in it. There are certain taxonomic similarities between *Cobaea* and members of the Bignoniaceae, although the 3-celled ovary of this genus is not duplicated in any known representative of the family mentioned. Also *Cantua* and *Fouquieria* show some taxonomic relationship. It may be that when the natural relationships of the genera now placed in the Cobaeoideae are deciphered, these may be found to properly belong elsewhere. It will suffice for the present to say that the cytological picture presented by *Cobaea* and *Cantua* material is decidedly different from that shown by other members of the *Phlox* family.

As indicated above, the genera *Collomia*, *Gilia*, *Hugelia*, *Linanthus*, *Leptodactylon*, *Ipomopsis*, together with about six others, are often collectively grouped and all their representatives called "Gilias". According to Craig's work (1934) *Hugelia* has considerable taxonomic claim to being grouped as a sub-division of the genus *Gilia*. Certain of the other genera, however, do not appear to have close enough taxonomic affinities to be lumped with *Gilia*, and the cytological differences found tend to substantiate the taxonomical relationships.

Thus, members of the genus *Collomia* have 8 pairs of chromosomes (or multiples thereof) and by this number are distinguished cytologically from all other representatives of the family. This and other cytological features (see Table 2 above) support the contention of many taxonomists that Gray made a serious error in combining this genus with the genus *Gilia*.

Gilia achilleaefolia is representative of the true Gilias in taxonomic and in cytological characters. The above table lists the most conspicuous cytological distinctions of this member of the group. *Gilia rigidula* and *G. tricolor* are among the other good species of this group. Figs. 1, 2, 7, and 8 depict the chromosomes of these species.

The species usually listed as *Gilia rubra*, *G. aggregata*, and *G. longiflora* seem to be closely related morphologically. A study of their chromosomes strengthens the view that they are indeed very closely related to each other and are different enough from the true Gilias to be worthy of the generic distinction sometimes accorded them in placing them in the genus *Ipomopsis*, proposed by Michaux as early as 1803.

A representative *Hugelia* species (see Table 1) apparently has only 7 pairs of chromosomes, thus differing from plants which unquestionably belong in *Gilia*. Chromosome numbers then would lend support to the contentions of Bentham (1833) and of Jepson (1925) that *Hugelia* is generically distinct rather than a sub-genus of *Gilia*, as urged recently by Craig, i.e.

The species sometimes placed in the genera *Linanthus* and *Leptodactylon* have 9 pairs of chromosomes. In that respect there is no cytological difference between these and the true Gilias. However these segregates from *Gilia* prove to have measurably smaller chromosomes; the exact figures for representatives of each group may be compared in table 2 above. Hence the cytological evidence tends to substantiate the taxonomical facts which favor the setting apart of these two genera. No cytological differences have yet been observed, however, between *Linanthus* and *Leptodactylon*.

The remaining two cytological groups that may be recognized are those observed in the genera *Phlox* and *Polemonium*. The present study confirms the earlier descriptions of the chromosome pictures observed in these genera by Flory, l.c., and Clausen, l.c.

Drawings of the chromosomes of species representative of the different cytological groups are shown in Figs. 1-19.

Detailed descriptions of the cytological groups are not given here. The chief data bearing on such descriptions are given in Table 2 of the preceding section.

In some plant groups there seems to be no connection between chromosome numbers and taxonomic relationships. An example of this is furnished by the work of Gershoy (1934) on *Viola*. In many cases, however, there does appear to be a definite correlation between chromosome number, morphology, etc., and the other affinities of related forms. Where taxonomical relationships are best understood in the Polemoniaceae (as in the genus *Phlox*), closely related plants are found to have chromosome complements identical in number of elements and similar in appearance. It has seemed reasonable to assume then, in the discussion of this family, that chromosome characters such as number per complement, size, and structure, are valuable diagnostic characters of the species and genera concerned.

Summary

Previously unreported counts on 40 well differentiated species or varieties of the Polemoniaceae are given. Included with these is a general account of all chromosome numbers reported for species of this family to date. This is followed by a summary of chromosome size, chromosome morphology, and the different cytological groups observed. There is a discussion on the taxonomic grouping implied by the cytological facts.

The author wishes to thank Professor Orland E. White and Professor Edgar T. Wherry for gifts of materials, and for their interest in this work. To Professors E. T. Wherry, Karl Sax, and S. H. Yarnell grateful acknowledgement is made for their critical reading of the manuscript.

This study was begun at the Blandy Experimental Farm of the University of Virginia, and was continued while the writer was a Fellow of the National Research Council at Harvard University.

Literature Cited

- Belling, J. 1926. The iron-acetocarmine method of fixing and staining chromosomes. Biol. Bull. 50: 160-161.
Bentham, George. 1833. Bot. Reg. 19: sub. t. 1622.

- Clausen, J. 1931. Genetic studies in *Polemonium*. III. Preliminary account on the cytology of species and specific hybrids. *Hereditas* 15: 62-66.
- Craig, T. 1934. A revision of the subgenus *Hugelina* of the genus *Gilia* (Polemoniaceae). *Bull. Torr. Bot. Club*. 61: 385-396; 411-428.
- Flory, W. S., Jr. 1934. A cytological study on the genus *Phlox*. *Cytologia* 6: 1-18.
- Gershoy, A. 1934. Studies in North American violets. III. Chromosome numbers and species characters. *Ver. Agr. Exp. Sta. Bull.* 367.
- Jepson, W. L. 1925. A manual of the flowering plants of California. Associated Student Store, Berkeley. pp. 782, 792.
- Johansen, D. A. 1935. Dehydration and infiltration. *Science*, N. S. 82: 253-254.
- Lawson, A. A. 1898. Some observations on the development of the karyokinetic spindle in the pollen-mother-cells of *Cobaea scandens* Cav. *Proc. Calif. Acad. Sci. Ser. III*, 1: 170-188.
- Schnarf, K. 1921. Kleine Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Angiospermen. I. *Gilia millefoliata* Fisch. et Mey. *Oesterr. Bot. Zeitschr.* 70: 153-158.
- Warmke, H. E. 1935. A permanent root tip smear method. *Stain Tech.* 10: 101-103.
- Zirkle, C. 1930. The use of n-butyl alcohol in dehydrating woody tissue for paraffin embedding. *Science* 71: 103-104.
-

Beitrag zum Intersexualitätsproblem bei *Aucuba japonica* Thunb.*

Von
Yukio Yamamoto

Das erste Intersex von *Aucuba japonica* wurde im J. 1929 von KIHARA entdeckt und von HOSONO (1933) näher untersucht. Seither wurden mehrere Intersexe bei dieser Pflanze von den Mitgliedern unseres Instituts gefunden. Im folgenden werden die Beobachtungen bei einigen dieser Pflanzen kurz mitgeteilt.

Material

Der Hauptgegenstand der morphologisch-karyologischen Untersuchungen war ein in den Anlagen unserer Universität gezogenes männliches Intersex, Nr. 2.¹⁾ Außerdem konnte ich noch an einigen anderen in der Umgebung von Kyoto wildwachsenden Intersexen Beobachtungen anstellen.

Die Fixierung der Blütenknospen wurde mit CARNOY's Flüssigkeit, die der Wurzelspitzen mit LA COUR's 2BE-Lösung ausgeführt. Die Mikrotomschnitte waren sowohl bei Blütenknospen als auch bei Wurzelspitzen 18 μ dick.

Äußere Morphologie

A. japonica ist eine morphologisch streng getrenntgeschlechtige Pflanze. Die Blüten der Weibchen zeigen keine Spur von Andrözeum, in denjenigen der Männchen nimmt die Stelle des Pistills eine rautenförmige Vertiefung ein (Abb. 2-b). Der Blütenboden ist bei den weiblichen Blüten zylinderförmig, bei den männlichen trichterförmig (Abb. 1-a, c). Die Infloreszenz der Männchen stellt eine lockere lang gestielte Ähre dar; bei den Weibchen ist sie fast sitzend und büschelförmig (Abb. 3 u. 4).

Bei den Intersexen findet man allerlei Übergänge zwischen

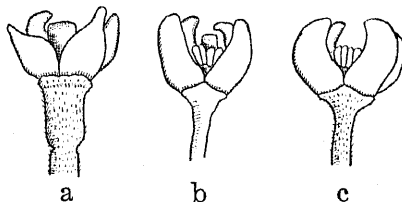


Abb. 1. a Blüte eines normalen Weibchens. b Gemischtgeschlechtige Blüte eines männlichen Intersexes. c Blüte eines normalen Männchens. (a, b u. c Seitenansicht). Vergr. 12-fach.

* Contributions from the Laboratory of Genetics, Biological Institute, Department of Agriculture, Imperial University, No. 80.

1) Hosono's Intersex war als Nr. 1 bezeichnet.

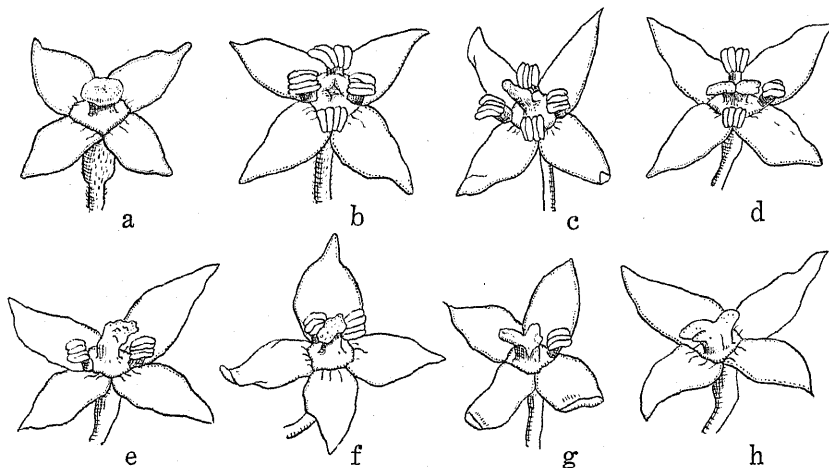


Abb. 2. a Blüte eines normalen Weibchens. b Blüte eines normalen Männchens. c-h Blüten des Intersexes Nr. 2. c Mit 4 Antheren. d Mit 3 Antheren. e-f Mit 2 Antheren. g Mit 1 Anthere. h Weibliche Blüte ohne Antheren. Vergr. 12-fach.



Abb. 3-4. Blütenstände der Intersexe. 3. Weibliches Intersex. 4. Männliches Intersex.

beinäh rein männlichen und rein weiblichen Blüten. Eine kleine statistische Untersuchung über die variierende Zahl der Antheren in den Blüten des männlichen Intersexes Nr. 2 findet sich in Tab. 1 (die Blüten der normalen Männchen haben bekanntlich 4 Staubgefäße).

Die Morphologie der Blüten der intersexuellen Pflanzen stellt sich verschieden dar, je nachdem ob man mit einem männlichen oder einem weiblichen Intersex zu tun hat. Die voll männlichen Blüten der männlichen Intersexe mit 4 Staubgefäßen haben keine rauten-

förmige Vertiefung an Stelle des Pistills, sondern ein fortsatzförmiges Rudiment des weiblichen Organs. Den weiblichen Blüten fehlt zwar das Andrözeum vollständig, ihr Pistill hat aber eine anormale, unregelmäßig gelappte Gestalt (Abb. 2-h). Bei den weiblichen Intersexen hingegen ist das Pistill in den weiblichen Blüten durchaus normal gestaltet; rein männliche Blüten konnte ich nicht finden. Die Infloreszenz hat bei den männlichen Intersexen typisch männliche, bei den weiblichen typisch weibliche Gestalt (Abb. 3-4). Gestalt und Färbung der Blätter sind bei *Aucuba* im allgemeinen ziemlich variabel. Intersex Nr. 2 hatte längere und schmalere sowie dunkler grüne Blätter als die typischen betreffs des Geschlechtsausdrucks normalen Pflanzen. Ob diese Unterschiede mit der Intersexualität der betreffenden Pflanze zusammenhängen oder nur ein Ausdruck der gewöhnlichen Variabilität sind, muß dahingestellt bleiben (Abb. 5-a, b u. c).

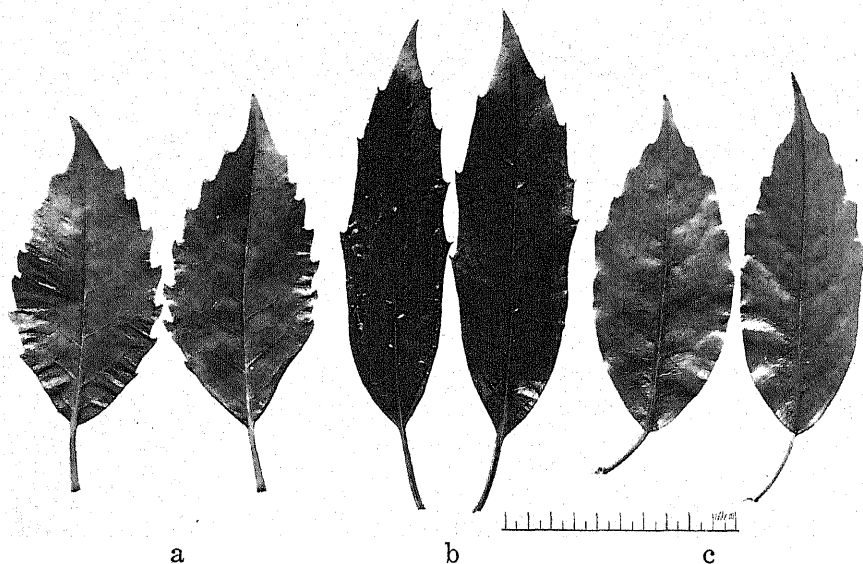


Abb. 5. Blätter der Weibchen, Intersexe und Männchen. Von links nach rechts: normales Weibchen, Intersex Nr. 2, normales Männchen.

Es ist ferner von Interesse, daß der Blütenboden bei dem Intersex Nr. 2 nur spärlich behaart war, während die normalen Pflanzen beider Geschlechter an dieser Stelle reichliche Behaarung aufweisen (Abb. 1-a, b u. c).

Zahlenverhältnis der Geschlechter

Nach KIHARA's Angabe (1935) überwiegt deutlich das männliche Geschlecht; er fand 60% ♂ und 40% ♀. Meine eigene Aus-

Tabelle 1. Versuchspfl. Nr. 2. Die in 100 Blüten gefundenen Zahlen der Staubfäden

Anz. d. Staubf.	0	1	2	3	4	Summe
Anz. d. Blüten	3	9	12	17	59	100

Tabelle 2. Zahlenverhältnis der Geschlechter bei wildwachsender *Aucuba japonica*

Standort	Geschlecht			Summe
	♀	♂	♂	
I. Kibune	294	517	3	814
II. Kurama	314	551	4	869
Summe	608	1068	7	1683
%	36.1	63.5	0.4	100

zählung ergab ein ähnliches Resultat, wie aus Tab. 2 hervorgeht. Leider mußte auch ich mich bei dieser Untersuchung auf die im Freien vorkommenden Populationen beschränken, da die Aufzucht von *Aucuba* aus Samen bis zum Blühen mehrere Jahre erfordern würde.

Dieses Zahlenverhältnis ist insofern von Interesse, als bei anderen

bis jetzt untersuchten diözischen Pflanzen (WINGE 1923, KIHARA u. ONO 1923, NOHARA 1923, CORRENS 1928, MALHOTRA 1930 und KIHARA u. HIRAYOSHI 1933) das weibliche Geschlecht in überwiegender Zahl notiert wurde, soweit die nicht das Verhältnis 1:1 realisierten.

Die Intersexe traten in dem von mir untersuchten Material mit einer Häufigkeit von 0.4% auf.

Karyologische Beobachtungen

Die haploide Chromosomenzahl von *A. japonica* beträgt 16 (SUGIURA 1927, MEURMAN 1929, SINOTÔ 1929 und HOSONO 1933). Eine eingehende karyomorphologische Untersuchung des Chromosomensatzes hat MEURMAN ausgeführt. Er unterscheidet je nach Gestalt und Größe acht deutlich verschiedene Chromosomentypen in der somatischen Garnitur (vgl. Abb. 7), deren jeder vier Mal vertreten ist. Die Weibchen und Männchen haben das gleiche Chromosomensortiment; morphologisch unterscheidbare Geschlechtschromosomen konnten nicht festgestellt werden. MEURMANs Befunde stimmen mit meinen Beobachtungen überein.

Die Untersuchung des somatischen Chromosomensortiments des Intersexes Nr. 2 ergab, daß es das gleiche ist wie bei den normalen Pflanzen, aber 2 überzählige Fragmente enthält (Abb. 6 u. 7). Diese liessen



Abb. 6. Somatische Chromosomengarnitur des Intersexes Nr. 2. Vergr. 2000-fach.

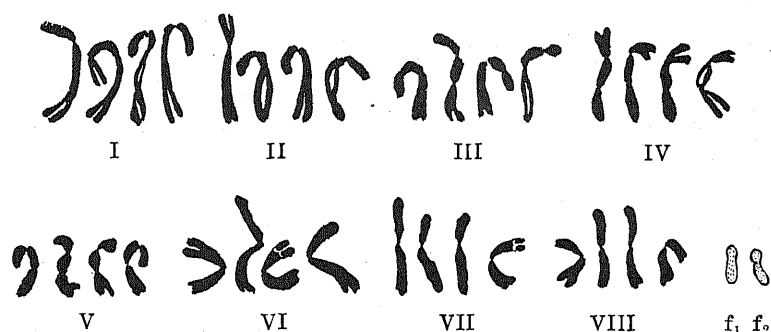


Abb. 7. Die Chromosomen der Abb. 6, nach den morphologischen Typen gruppiert.

sich auch in den Reifungsteilungen feststellen (Abb. 8 u. 9). Die Reifungsteilungen sind bei dem Intersex noch bedeutend unregelmäßiger als bei den normalen Pflanzen, bei denen sich aus der Autotetraploidie von *A. japonica* ergebende Unregelmäßigkeiten oft vorkommen (vgl. MEURMAN 1929 und KIHARA u. YAMAMOTO 1935).

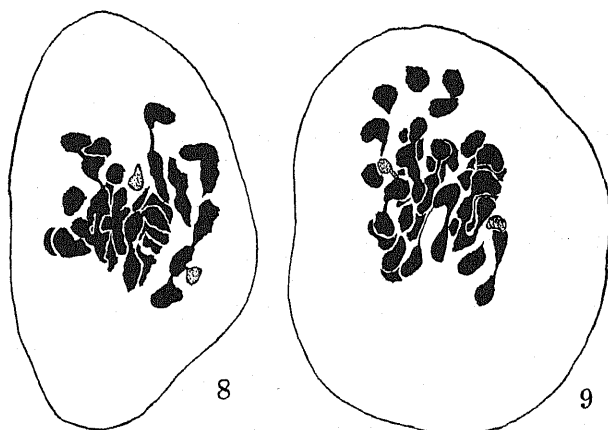


Abb. 8-9. I. Metaphase der P.M.Z. Vergr. 1500-fach. (In Abb. 6-9 sind die Fragmente punktiert.)

Fertilitätsverhältnisse

Tab. 3 und 4 orientieren über die Fertilität der normalen Männchen bzw. Weibchen. Beide Geschlechter weisen eine ziemlich gute Fertilität auf.

Die Untersuchung des Pollens des männlichen Intersexes Nr. 2 ergab 50% tauglich aussehende Pollenkörner, wie aus Tab. 5 hervorgeht. Von den mit diesen Pollen bestäubten Blüten eines normalen Weibchens haben aber nur 14% angesetzt.

Auf weiblicher Seite war Nr. 2 vollkommen

Tabelle 3. Pollenbeschaffenheit bei normalen Männchen

Pollen-kategorien	Äußerlich normal	Inhaltsarm	Summe
Beobachtet	1945	555	2500
%	77.8	22.2	100

Tabelle 4. Fruchtbarkeit der normalen Weibchen
(nach künstlicher Bestäubung, nach KIHARA
und YAMAMOTO 1935)

Anz. d. Blüten	Anz. d. Befruchtungssamen	%
200	160	80

Tabelle 5. Pollenbeschaffenheit bei dem
Intersex Nr. 2

Pollen- kategorien	Äußerlich norm.	Inhaltsarm	Summe
Anz. d. P.	267	233	500
%	53.4	46.6	100

steril; es waren also nur die männlichen Organe dieser Pflanze funktionsfähig. Dieser Befund stimmt zu dem Verhalten der männlichen Intersexe gegen Kaliumchlorat (untersucht wurde das Intersex Nr. 1 /vgl. HOSONO 1933/), welches genau das gleiche war wie das der normalen Männchen (YAMAMOTO 1936).

Schlußbetrachtung

Die Chromosomengarnitur des männlichen Intersexes Nr. 2 unterscheidet sich von derjenigen normaler Pflanzen nur durch das Vorkommen von 2 überzähligen Fragmenten. Der Fall ist demnach dem von HOSONO untersuchten, der 1 solches Fragment gefunden hat, ganz ähnlich. Da die 2 bis jetzt karyologisch näher bekannten Intersexe sich durch überzählige Fragmente auszeichnen, liegt die Annahme eines Zusammenhangs zwischen deren Vorkommen und der Intersexualität bei *Aucuba* nahe. Sollte eine solche Beziehung tatsächlich vorhanden sein, so müßte man annehmen, daß der Genbestand der betreffenden Fragmente Weiblichkeitsgene enthält, durch deren Duplizierung das normale quantitative Verhältnis der Differenziatoren gestört und der Geschlechtsausdruck entsprechend verändert wurde. Doch sind noch weitere Untersuchungen zur Sicherstellung eines derartigen Zusammenhangs nötig.

Fragmentierung von Chromosomen in der Meiosis dürfte bei *A. japonica* kein seltener Vorgang sein. Die Pflanze ist, wie oben erwähnt, autotetraploid und ihre Reifungsteilungen weisen im Zusammenhang damit eine Reihe Unregelmäßigkeiten auf, abgesehen von der für sie charakteristischen Ringbildung aus einer variierenden Chromosomenzahl. Es treten in der I. Metaphase außer der Verkettung Uni-, Bi-, Tri- und Tetravalente auf. Ferner wurde beobachtet, daß die Trennung bei 6 Paaren sich in der I. Anaphase merklich verzögert. Dadurch werden die betreffenden Chromosomen oft zu langen Brücken ausgezogen, wobei sie leicht in 2 oder mehr Segmente zerfallen können. Eine Fragmentierung der Träger der Geschlechtsgene müßte, wenn die sie enthaltenden Fragmente der Elimination nicht anheimfallen würden, eine Verschiebung des

quantitativen Verhältnisses dieser Gene nach sich ziehen und Intersexualitätserscheinungen hervorrufen.

Zum Schluß sei es mir gestattet Herrn Prof. Dr. H. KIHARA, der mir zu dieser Arbeit die wohlwollende Anregung gegeben hat, auch hier meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Ebenso bin ich Herrn Doz. Dr. I. NISHIYAMA für seine Hilfe bei der Prüfung des Zahlenverhältnisses der Geschlechter zu Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis

- Correns, C. 1928. Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechts bei den höheren Pflanzen. Handb. d. Vererbswiss. Bd. II, C.
- Hosono, S. 1933. Ein Fall von Intersexualität bei *Aucuba japonica* (japanisch). Jap. Journ. Gen. 8: 227.
- Kihara, H. 1935. Genetik (japanisch). Iwanamizensho 67: Tokyo.
- und I. Hirayoshi, 1933. Die Geschlechtschromosomen von *Humulus japonicus* STEB. et ZUCC. Rep. 8th Cong. Jap. Assoc. Adv. Sci. 8: 363-368.
- and T. Ono, 1923. Cytological studies on *Rumex*. II. Bot. Mag. (Tokyo) 37: 147-149.
- und Y. Yamamoto, 1935. Chromosomenverhältnisse bei *Aucuba chinensis* BENTH. Agric. & Hort. Tokyo, 10: 2485-2496.
- Malhotra, R. C. 1930. The sex ratio in *Asparagus officinalis* L. and its artificial modification. Journ. Gen. 23: 157-172.
- Meurman, O. 1929. Association and types of chromosomes in *Aucuba japonica*. Hereditas 12: 179-209.
- 1930. Chromosome morphology and ringformation in *Aucuba*. Proc. 5th Intern. Bot. Congr. Cambridge. 235.
- Nohara, S. 1923. Genetische Untersuchungen bei *Spinacia oleacea* L. (japanisch). Jap. Journ. Gen. 2: 45-54.
- Sinotô, Y. 1929. Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. Cytologia 1: 109-191.
- Sugiura, T. 1927. Some observations on the meiosis of the pollen mother cells of *Carica papaya*, *Myrica rubra*, *Aucuba japonica* and *Beta vulgaris*. Bot. Mag. (Tokyo) 41: 219-224.
- Winge, Ö. 1923. On sex-chromosomes, sex determination, and prepoderance of females in some dioecious plants. Compt. red. du. Labor. Carlsberg 15: 1-26.
- Yamamoto, Y. 1936. Über den Einfluß von Kaliumchlorat auf getrenntgeschlechtigen Pflanzen. Jap. Journ. Gen. 12: 73-80.

Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidinae

By

E. B. Babcock, G. L. Stebbins, Jr., and J. A. Jenkins

Division of Genetics, University of California, Berkeley, Calif.

Introduction

The cyto-genetic and taxonomic studies of *Crepis*, which have now been carried on for sixteen years, have amply demonstrated the value of this genus for such studies (Babcock and Navashin, 1930, Hollingshead and Babcock, 1930, Babcock and Cameron, 1934). In order to gain a better understanding of the origin and relationships of *Crepis*, and of the evolutionary processes in the subtribe Crepidinae as a whole, a study of the various other genera of this subtribe has been undertaken. This paper is intended as a preliminary report on this work, and presents the results obtained to date on the genera most nearly related to *Crepis*, and which have been studied sufficiently so that conclusions concerning them can be drawn.

Of the six genera included in this report, only two, *Lactuca* and *Ixeris*, have been previously examined cytologically to any extent. Ishikawa (1921) reported on the meiotic chromosomes of both of these genera, and obtained cytological evidence that *Ixeris* should be recognized as distinct. Marchal (1920) recorded, without illustrations, the haploid number $n = 8$ in *Lactuca perennis* and *L. virosa*, counts that have proved erroneous (see below), while Gates and Rees (1921) made a careful study of meiosis in *L. Scariola* and *L. sativa*, obtaining the haploid number $n = 9$ for these two species and *L. muralis*. In addition, the chromosome number of *Lactuca* (as *Mulgedium*) *tuberosa* has been counted by Poddubnaja-Arnoldi (ex Tischler 1936), of *Ixeris dentata* by Okabe (1932), of *I.* (as *Lactuca*) *denticulata* by Heitz (1929), of *Youngia* (as *Crepis*) *japonica* by Tahara (1910) and Hollingshead and Babcock (1930), of *Y.* (as *Lactuca*) *depressa* and of *Dubyaea hispida* (as *Crepis bhotanica*) by Babcock and Cameron (1934). A significant cyto-genetic study within this group is that of Ono and Satô (1935) on *Ixeris* (*Crepidiastrum*) *lanceolata* var. *latifolia* \times *I.* (*Paraiixeris*) *denticulata*.

Acknowledgment

To the following the writers are particularly indebted for the receipt of seeds and roots of many species: Mr. C. C. Deam, Mr. C.

H. Knowlton, Dr. S. F. Blake, Dr. R. Pampanini, Dr. H. H. Hu, Prof. Dr. W. Robyns, Dr. N. Shimotomai, Dr. S. Okabe.

To others who have generously sent material of various species, and to the directors of the numerous botanical gardens who have generously sent seeds of many species, we also wish to express our gratitude. We are also much indebted to Mr. Ernest Jund for valuable assistance in growing the cultures and in making the cytological preparations, and to the Park Naturalist, Yosemite National Park, and his assistants for their generous cooperation in germinating the seeds of the more difficult species.

Materials and Methods

Chromosome counts and morphological studies were made exclusively on somatic root tip metaphases. The root tips were fixed when the rosettes were growing vigorously in six inch pots in the greenhouse. Two fixatives were used: (1) Müntzing's (1932) modification of Navashin's chrom-acetic-formalin solution followed by the glycerin-butyl dehydration and embedding schedule, (2) Randolph's (1935) modification of chrom-acetic-formalin ("Craf") and embedded in paraffin according to his schedule.

Sections were cut from 10–12 μ and stained with either Smith's (1934) modification of crystal violet or with Stockwell's (1934) modification of Flemming's triple stain. The latter gave much better preparations, particularly in those species where there were many cytoplasmic inclusions.

The morphological studies of the chromosomes were complicated by the fact that the chromosomes in most of the species examined were quite long and twisted so that it was difficult, particularly in those with high numbers, to find plates in which they were well separated, and almost impossible to find plates in which all of them were in one plane. In addition there was some variability in the absolute length of the chromosomes, even in neighboring plates in the same section, though there was no indication that the relative length of the two arms of any chromosome was materially changed.

Plates were selected for drawing primarily because they were well spread and as "flat" as possible. Satellites were a secondary consideration, though an attempt was made to illustrate the total number found in any one species.

All drawings were made with the aid of a camera lucida using a Zeiss apochromat 90 \times , N.A. 1.3 objective and a Zeiss 30 \times compensating ocular, which gave a magnification of 5000 times at table level, and was reduced one-half in publication. This magnification is the same as that used in the previous papers on *Crepis*.

Table 1. Chromosome Numbers in Six Genera of Crepidinae

Note: Species listed in italics are here reported for the first time. Published counts verified by the writers are indicated with an !

Name and source of material	Accession numbers	Number plants examined	Somatic chromo. number	Figures
PRENANTHES, subgenus NABALUS				
<i>Prenanthes alba</i> L.				
Massachusetts, U.S.A.	216	1	32	Fig. 1b
West Virginia, U.S.A.	239	1	32	
<i>Prenanthes altissima</i> L.				
Maine, U.S.A.	174	1	16	
New Hampshire, U.S.A.	241	1	16	
<i>Prenanthes nana</i> (Bigel.) Torr.				
New Hampshire, U.S.A.	169	1	16	
<i>Prenanthes sagittata</i> (Gray) Nelson				
Montana, U.S.A.	170	3	16	Fig. 1d
<i>Prenanthes serpentaria</i> Pursh.				
New Jersey, U.S.A.	248	1	16	
<i>Prenanthes Tatarinowii</i> Maxim.				
Hopei, China	234	3	16	Fig. 1c
<i>Prenanthes trifoliolata</i> (Cass.) Fernald				
Maine, U.S.A.	171	1	16	Fig. 1a
PRENANTHES, subgenus EUPRENANTHES				
<i>Prenanthes cacaliaefolia</i> (M. Bieb.) Beauverd				
Tiflis, U.S.S.R.	293	1	18	Fig. 1e
<i>Prenanthes purpurea</i> L.				
*Paris, France	3342	2	18	Fig. 1f
DUBYAEA				
<i>Dubyaea hispida</i> (Don) DC: Babcock and Cameron, (1934) (<i>Crepis bhotanica</i> Hutchinson)				
Northern India	3245, 3361	2	16	Fig. 2b
*Edinburgh, Scotland	48, 53	2	16	
*Darjeeling, India	60	1	16	
+ <i>Dubyaea oligocephala</i> (Sch. Bip.) Stebbins (<i>Paleya oligocephala</i> Sch. Bip.)				
Kashmir, India	3311	2	16	Fig. 2a
LACTUCA, subgenus MULGEDIUM				
<i>Lactuca Bourgaei</i> , (Boiss.) Bornm.				
*Kew, England	3369	1	16	Fig. 3a
*Edinburgh, Scotland	54	1	16	
<i>Lactuca floridana</i> (L.) Gaertn.				
Maryland, U.S.A.	272	1	34	
+ <i>Lactuca Marschallii</i> Stebbins (<i>Mulgedium prenanthoides</i> (M. Bieb.) DC.)				
*Lund, Sweden	202	2	16	
<i>Lactuca Plumieri</i> (L.) Gren. & Godr.				
*Geneva, Switzerland	38	2	16	Fig. 3b
*Leyden, Holland	64	1	16	
<i>Lactuca Raddeana</i> Maxim.; Ishikawa, (1921): n = 9			(18)	
<i>Lactuca sibirica</i> (L.) Benth.				
*Paris, France	115, 3330	6	18	Fig. 3c
<i>Lactuca spicata</i> (Lam.) Hitchc.				
New Jersey, U.S.A.	243	1	34	
Indiana, U.S.A.	220	1	34	
California, U.S.A.	307	1	34	

Table 1. (Continued)

Name and source of material	Accession numbers	Number plants examined	Somatic chromo. number	Figures
<i>Lactuca tatarica</i> (L.) C.A. Mey. Cap D' Antibes, France	164	1	18	
<i>Lactuca villosa</i> Jacq. Virginia, U.S.A.	271	1	34	
Maryland, U.S.A.	273	1	34	
Louisiana, U.S.A.	290	1	34	
LACTUCA, subgenus SORORIA				
<i>Lactuca rostrata</i> (Blume) Boerl. Mt. Gedeh, Java	233	1	18	Fig. 3d
LACTUCA, subgenus LACTUCOPSIS				
+ <i>Lactuca aurea</i> (Sch. Bip.) Stebbins (<i>Mulgedium sonchifolium</i> Vis.) Sofia, Bulgaria	308	1	16	
<i>Lactuca bracteata</i> Hook. f. & Thoms. *Edinburgh, Scotland	49	1	16	Fig. 3e
<i>Lactuca Schulzeana</i> Büttner Dalatando, Angola, tropical Africa	279	2	16	Fig. 3f
<i>Lactuca Haemanniana</i> , Aschers. Cirenaica, North Africa	74	1	16	
LACTUCA, subgenus MYCELIS				
<i>Lactuca muralis</i> (L.) Fresen.: Gates and Rees (1921): n = 9 *Copenhagen, Denmark	103	1	18	
Hohenstein, Germany	178	1	8	
*Lund, Sweden	200	1	18	Fig. 4b
LACTUCA, subgenus PHAENIXOPUS				
<i>Lactuca orientalis</i> Boiss. Gümüş-Khaneh, Turkey	3314	3	36	
<i>Lactuca viminea</i> (L.) J. & C. Presl. Gümüş-Khaneh, Turkey	3316	3	18	
*Paris, France	3335	5	18	Fig. 4a
LACTUCA, subgenus SCARIOLO				
<i>Lactuca campestris</i> Greene Indiana, U.S.A.	226	1	34	
<i>Lactuca canadensis</i> L. var. <i>typica</i> Wiegand Ohio, U.S.A.	179	1	34	
var. <i>integrifolia</i> (Bigel.) Wiegand Maine, U.S.A.	214	1	34	
var. <i>latifolia</i> O. F. Ktze Vermont, U.S.A.	212	1	34	
Massachusetts, U.S.A.	211	1	34	
var. <i>obovata</i> Wiegand Indiana, U.S.A.	221	1	34	
Ohio, U.S.A.	181	1	34	
<i>Lactuca cretica</i> , Desf. Cirenaica, North Africa	75	1	16	Fig. 4d
Lebanon, Syria	262	1	16	
<i>Lactuca graminifolia</i> Michx. Florida, U.S.A.	3379	2	34	Fig. 4g
<i>Lactuca indica</i> L. China	373	1	18	
<i>Lactuca laciniata</i> (Houtt.) Makino: Ishi- kawa, (1921): n = 9 Peiping, China	235	1	18	Fig. 4h

Table 1. (Continued)

Name and source of material	Accession numbers	Number plants examined	Somatic chromo. number	Figures
<i>Lactuca leptcephala</i> , Stebbins (cf. Stebbins, 1936)				
Belgian Congo	335	1	16	
<i>Lactuca perennis</i> L.				
*Cologne, Germany	80	2	18	Fig. 4e
*Hamburg, Germany	4, 6	5	18	
<i>Lactuca saligna</i> L.				
Quebec, Canada	184, 185	2	18	
<i>Lactuca scariola</i> L.: Ishikawa, (1921); Gates & Rees, (1921): n = 9				
Geitswald, Germany	31	2	18	
Gümüşh-Khaneh, Turkey	3318	1	18	
*Bucharest, Roumania	24	1	18	
Tashkent, U.S.S.R.	27	2	18	
Simla, India	140	1	18	
<i>Lactuca tenerrima</i> Pourr.				
Majorca Island, Spain		2	16	Fig. 4c
<i>Lactuca tuberosa</i> (L.f.) Jacq. Poddubnaja-Arnoldi, ex Tischler, (1936): (n = 8)			(16)	
<i>Lactuca virosa</i> L.				
*Paris, France	3331	3	18	
*Königsberg, Germany	33	2	18	
*Oslo, Norway	139	1	18	
*Leyden, Holland	302	1	18	Fig. 4f
<i>Cephalorrhynchus glandulosus</i> Boiss.				
*Sofia, Bulgaria	3324	2	18	
YOUNGIA				
<i>Youngia depressa</i> (Hook. f. et Thoms.) Babc. & Stebbins				
(<i>Lactuca depressa</i> Babc. & Cameron)				
Babcock and Cameron, (1934)			16?	
<i>Youngia japonica</i> (L.) DC. Tahara, (1910) et al.: n = 8			16!	
<i>Youngia paleacea</i> (Diels) Babc. & Stebbins (<i>Crepis paleacea</i> Diels, see Babcock and Stebbins, 1937)				
Yunnan, China	3266, 3267 3268, 3269, 3270	6	32	Fig. 5b
<i>Youngia stenoma</i> (Turcz.) Ledeb.				
Mongolia	3257	4	16	Fig. 5a
<i>Youngia tenuifolia</i> (Willd.) Babc. & Stebbins				
(<i>Crepis tenuifolia</i> Willd.) Babcock and Cameron, (1934)			15, 20, 24	
IXERIS, subgenus EUIXERIS				
<i>Ixeris alpicola</i> Nakai: Ishikawa, (1921): n = 7			(14)	
<i>Ixeris chinensis</i> (Thunb.) Nakai: Ishikawa: n = 16			32!	
<i>Ixeris dentata</i> (Thunb.) Nakai: Okabe, (1932)			21!	
<i>Ixeris graminea</i> (Fisch.) Nakai: Hollingshead and Babcock, (1930)			16	
<i>Ixeris japonica</i> (Burm.) Nakai: Ishikawa: n = 24			(48)	
<i>Ixeris polyccephala</i> Cass.: Ishikawa: n = 8			(16)	
<i>Ixeris repens</i> (L.) Gray: Ishikawa: n = 8			(16)	
<i>Ixeris stolonifera</i> Gray: Ishikawa: n = 8			16!	

Table 1. (Continued)

Name and source of material	Accession numbers	Number plants examined	Somatic chromo. number	Figures
IXERIS, subgenus PARAIXERIS				
+ <i>Ixeris chelidoniifolia</i> (Makino) Stebbins: Ishikawa: $n = 5$			(10)	
+ <i>Ixeris denticulata</i> (Houtt.) Stebbins +subsp. <i>typica</i> (Maxim.) Stebbins (<i>Lactuca denticulata</i> (Houtt.) Maxim.): Ishikawa: $n = 5$, Heitz, (1929)			10!	
+subsp. <i>ramosissima</i> (Benth.) Stebbins Hong Kong, China	194	3	10	Fig. 5c
+subsp. <i>sonchifolia</i> (Bunge) Stebbins Peiping, China	237	3	10	Fig. 5d
IXERIS, subgenus CREPIDIASTRUM				
+ <i>Ixeris Keiskeana</i> (Maxim.) Stebbins: Ishikawa (1921): $n = 5$			(10)	
+ <i>Ixeris lanceolata</i> subsp. <i>platyphylla</i> (Makino) Stebbins (<i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i> Nakai) Ishikawa, (1921); Ono & Satô, (1935): $n = 5$			10!	
+ <i>Ixeris linguaeifolia</i> Gray (<i>Crepidiastrum linguaeifolium</i> Nakai) Bonin Islands, Japan	341	2	10	Fig. 5e

* Seed obtained from Botanical Gardens

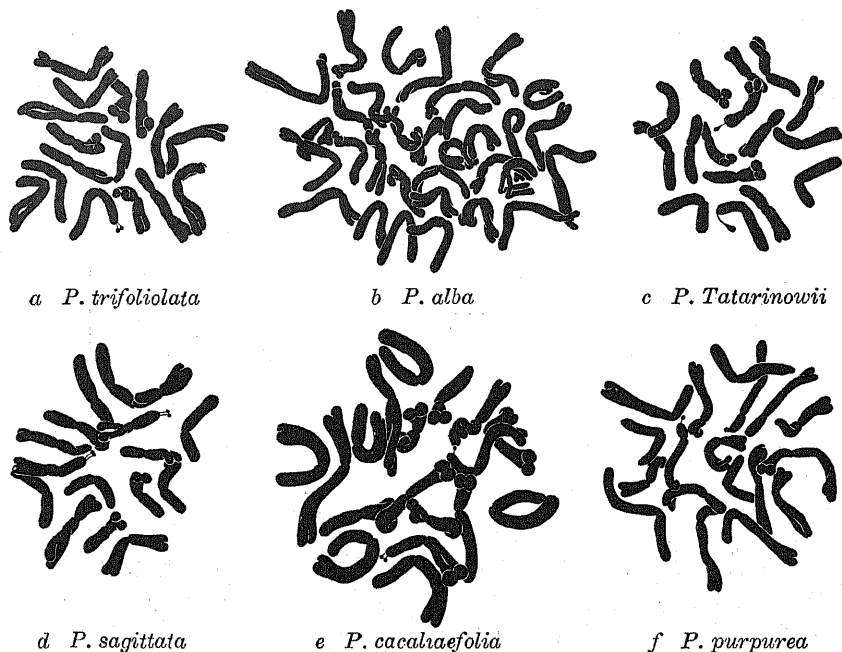
+ For the origin of the names indicated by this sign, see Stebbins (1937).

Description

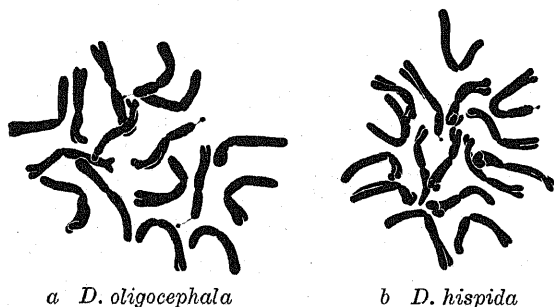
Nine out of thirty-five species, representing both subgenera of *Prenanthes*, have been examined. The species *P. alba* ($2n = 32$, Fig. 1b), *P. altissima* ($2n = 16$), *P. nana* ($2n = 16$), *P. sagittata* ($2n = 16$, Fig. 1d), *P. serpentaria* ($2n = 16$), *P. Tatarinowii* ($2n = 16$, Fig. 1c), and *P. trifoliolata* ($2n = 16$, Fig. 1a) are all on the basis of eight, whereas *P. cacaliaefolia* ($2n = 18$, Fig. 1e) and *P. purpurea* ($2n = 18$, Fig. 1f) in the subgenus *Euprenanthes* are on the basis of nine.

The chromosome morphology of these species is strikingly similar. All of the chromosomes within any specific genom are very much alike in shape and size, having median or submedian constrictions. The only morphological difference between the various genoms is in the absolute size of the chromosomes. The chromosomes of *P. cacaliaefolia* are definitely larger than those of *Nabalus*, though they have the same relative proportions. The species within the subgenus *Nabalus* itself show very little difference in size.

Dubyaea oligocephala ($2n = 16$, Fig. 2a) and *D. hispida* ($2n = 16$, Fig. 2b) have very similar genoms both in size and morphology, all of the chromosomes having median or submedian

Fig. 1. Chromosomes of *Prenanthes*.

constrictions. The idiograms of both species are strikingly similar to those in the subgenus *Nabalus* of *Prenanthes*.

Fig. 2. Chromosomes of *Dubyaea*.

In *Lactuca*, 30 out of about 150 species, representing all but one of the subgenera, have been studied. The subgenus *Mulgedium*,¹⁾ exclusive of the American species, has the two basic numbers eight and nine. The species with eight as a basic

number, namely: *L. Bourgaei* ($2n = 16$, Fig. 3a), *Lactuca Marschallii* ($2n = 16$), and *L. Plumieri* ($2n = 16$, Fig. 3b) all have a similar idiogram. One pair has an almost median constriction and the remainder are definitely sub-terminal, grading off to a small pair with a round head. *L. sibirica* ($2n = 18$, Fig. 3c) and *L. tatarica* ($2n = 18$) both have essentially the same idiogram which differs from

1) This subgenus is recognized in the same sense as the genus of Cassini, i.e., to include all of those species in which the involucre is well imbricated, and the achene is unbeaked or has a short, stout beak.

the eight-paired species in the addition of a small pair of medianly constricted chromosomes. There is some variation in the absolute size of the chromosomes within this subgenus, but it is not marked.

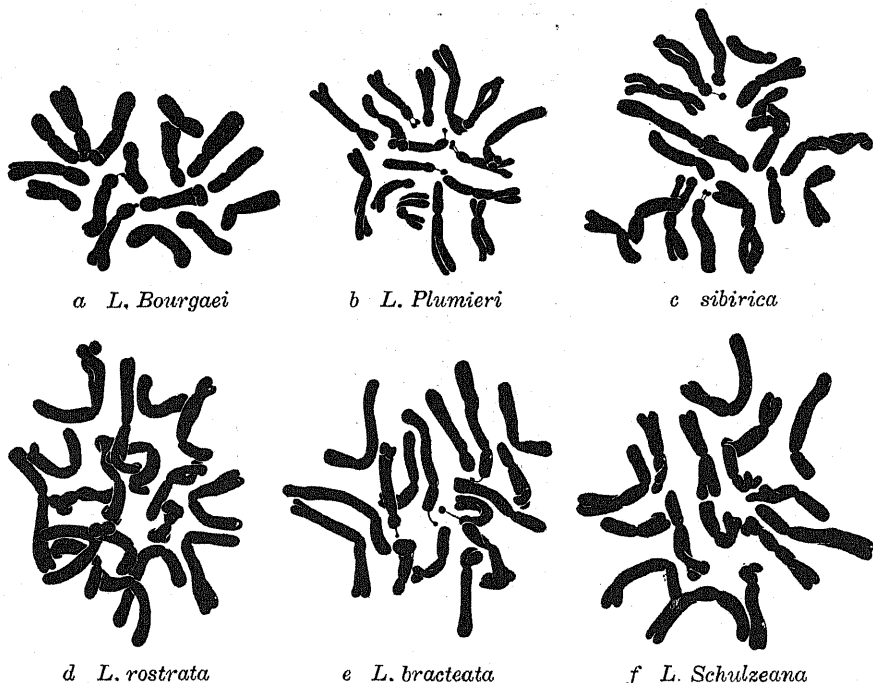


Fig. 3. Chromosomes of *Lactuca*, subgenera: *Mulgedium*, *Sororia* and *Lactucopsis*.

L. rostrata ($2n = 18$, Fig. 3d) is the only species in the subgenus *Sororia* examined. The chromosome morphology is quite distinct from that in the subgenus *Mulgedium* in that all of the chromosomes have median or sub-median constrictions. There is a very close resemblance between the chromosomes of *L. rostrata* and those in the subgenus *Euprenanthes* in number, morphology and size. The absolute size of the chromosomes in *L. rostrata* is somewhat greater than in the species of the subgenus *Mulgedium*.

Four species: *L. aurea* ($2n = 16$), *L. bracteata* ($2n = 16$, Fig. 3e), *L. Haimanniana* ($2n = 16$), *L. Schulzeana* ($2n = 16$, Fig. 3f) in the subgenus *Lactucopsis* are on the basis of eight. The chromosomes are somewhat larger, but on the whole very similar to those of the sixteen chromosome species in the subgenus *Mulgedium*, the only obvious difference being that two pairs rather than one have sub-median constrictions.

L. muralis ($2n = 18$, Fig. 4b) and *L. viminea* ($2n = 18$, Fig. 4a), the type species of the subgenera *Mycelis* and *Phaenioxopus*, both have idiograms very similar to *L. sibirica*, except that the absolute size of

the chromosomes is markedly reduced. The chromosomes of *L. orientalis* ($2n = 36$) are not so much reduced in size, though they too have mostly subterminal constrictions and a few small chromosomes with sub-median constrictions.

Leaving out of the discussion for the time being the American species, *L. campestris*, *L. canadensis*, and *L. graminifolia*, the subgenus *Scariola* has the two basic numbers eight and nine. There is considerable morphological variation in the nine series. *L. laciniata* ($2n = 18$, Fig. 4h), and *L. indica* ($2n = 18$), have the largest chromosomes of any species of this subgenus, and a high proportion with submedian constrictions. *L. Scariola* ($2n = 18$), *L. virosa* ($2n = 18$, Fig. 4f) and *L. saligna* ($2n = 18$) have a very similar genom to that of *L. sibirica*, i. e., mostly sub-terminal chromosomes

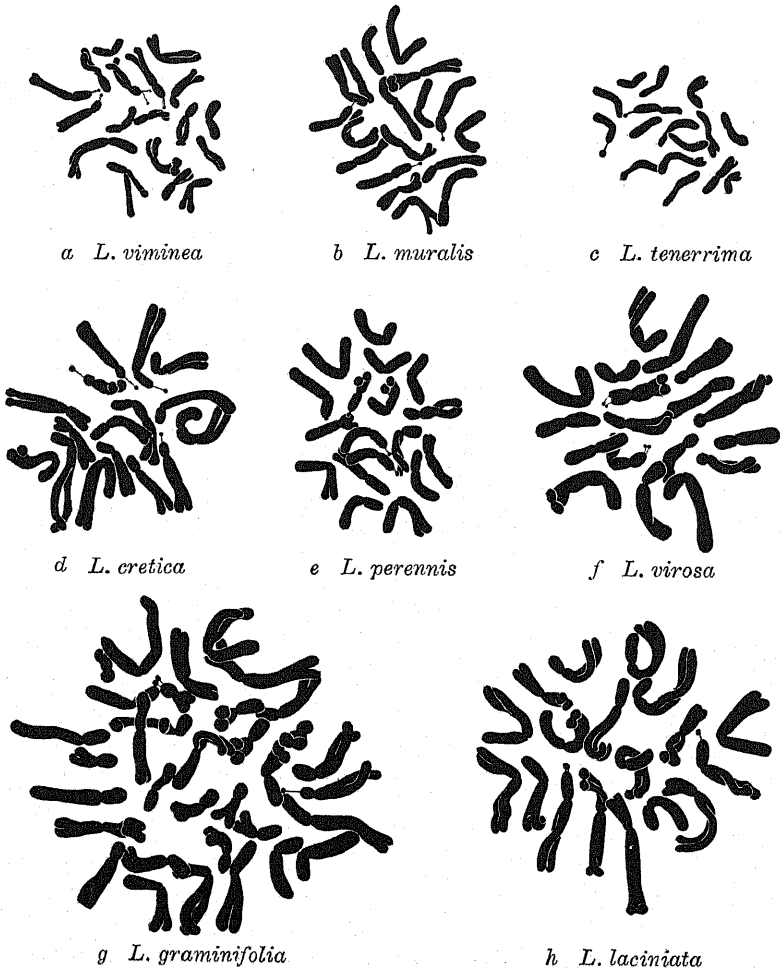


Fig. 4. Chromosomes of *Lactuca*, subgenera: *Phaenioxopus*, *Mycelis* and *Scariola*.

with one large almost submedian pair and a small pair of medianly constricted chromosomes. *L. perennis* ($2n = 18$, Fig. 4e) has smaller chromosomes than any of the nine-paired species of *Scariola*, and at the same time has more medianly constricted chromosomes. It also lacks the small pair of medianly constricted chromosomes characteristic of the *Scariola-virosa* group.

Of the species in the subgenus *Scariola* with eight as a basic number, *L. cretica* ($2n = 16$, Fig. 4d) has a similar idiogram to *L. Plumieri* of the subgenus *Mulgedium*, i. e., the chromosomes are decidedly subterminal with one pair almost submedian. The other two species examined, *L. tenerima* ($2n = 16$, Fig. 4c) and *L. leptcephala* ($2n = 16$) are very exceptional in that they have very small chromosomes of which it is difficult to determine the morphology. Their idiograms are strikingly different from any others in the genus.

The American species of *Lactuca*, namely *L. floridana* ($2n = 34$), *L. spicata* ($2n = 34$), *L. villosa* ($2n = 34$), of the subgenus *Mulgedium*, and *L. campestris* ($2n = 34$), *L. canadensis* ($2n = 34$), and *L. graminifolia* ($2n = 34$, Fig. 4g) of the subgenus *Scariola*, are all quite similar in chromosome morphology and chromosome size. In each species there are a few pairs of submedianly constricted chromosomes, but the majority are subterminally constricted. There is considerable variation in size between the chromosomes within any specific genom. Although Ishikawa (1921) recorded the haploid number $n = 9$ for *L. villosa*, it is doubtful from the results of the present study that his plant was of this American species.

Cephalorrhynchus glandulosus ($2n = 18$) differs morphologically from *Lactuca* chiefly in the anomalous character of its achenes, which are very little flattened and are five-sided, and resembles such species of *Lactuca* as *L. sibirica* and *L. virosa* in both the number and the morphology of its chromosomes. The material available was not satisfactory for illustration.

In *Youngia*, cytological study has been possible on only four or five species. The count previously reported by Babcock and Cameron (4) for *Youngia* (as *Lactuca*) *depressa* is somewhat doubtful. The plants grown from seed received from Ghose and Co., Darjeeling, India, as *Crepis depressa* did not flower and their rosette leaves were quite different in appearance from those of herbarium specimens of *Y. depressa*. *Y. stenoma* ($2n = 16$, Fig. 5a) is very similar in both chromosome number and morphology to the species of *Dubyaea* and of *Prenanthes* subgenus *Nabalus*, i. e., the chromosomes are medianly or submedianly constricted and are all very much alike. *Y. paleacea* ($2n = 32$, Fig. 5b) is a tetraploid, based on a haploid set similar to that of *Y. japonica* (Hollingshead and Babcock

1930, fig. 23c), except that the chromosomes are considerably larger.

Several species of *Ixeris* have been studied by Ishikawa (1921), as *Lactuca*, and the chromosome numbers of the following have been

confirmed by the present writers:

I. chinensis, *I. dentata*, *I. denticulata* subsp. *typica*, *I. stolonifera*. In the chart, Fig. 6, the names *Ixeris graminea* and *I. polycephala* are used as the correct synonyms for those species listed by Ishikawa as *L. tamagawensis*, and *L. Matsumurae* respectively. (See Kitamura, 1935).

Of the additional three forms listed

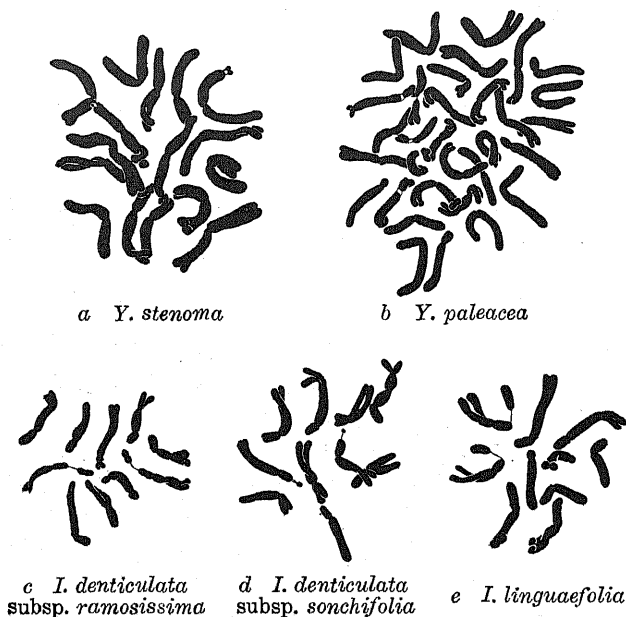


Fig. 5. Chromosomes of *Youngia* and *Ixeris*.

in the table, two, *I. linguaefolia* ($2n = 10$, Fig. 5e), and *I. denticulata* subsp. *ramosissima*, ($2n = 10$, Fig. 5c), agree with the other members of their subgenera in both the number and the morphology of their chromosomes. The genom of subsp. *sonchifolia* ($2n = 10$, Fig. 5d) although otherwise identical with that of the other subspecies of *I. denticulata*, includes a pair of normal sized satellites, rather than the large ones characteristic of the other subspecies.

Discussion

I. Phylogeny and chromosome number

The phylogenetic principles on the basis of which the position and relationships of the various genera and subgenera have been determined will be discussed elsewhere, but they are in general similar to those employed in the *Crepis* work. The relative position of the groups is illustrated in the accompanying chart (Fig. 6). In it the basic haploid numbers of the various genera are given after their names, and the species contained in each subgenus are listed within the smaller squares. With the exception of *Youngia*, in which the arrangement follows that in our monograph of the genus (Babcock

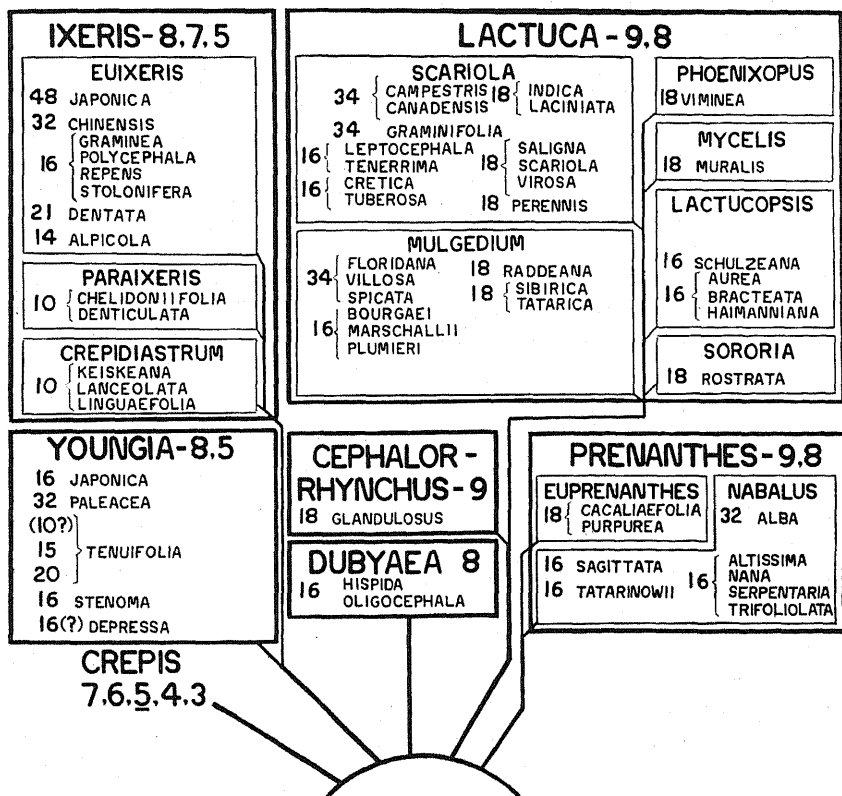


Fig. 6. Phylogenetic relationships of and the known chromosome numbers within the genera *Dubyaea*, *Prenanthes*, *Cephalorrhynchus*, *Lactuca*, *Ixeris*, and *Youngia*, and their subgenera.

and Stebbins, 1937), the species within the squares have not been arranged phylogenetically since their interrelationships are as yet incompletely known, but those closely related taxonomically and with the same chromosome number have been bracketed together, and their somatic number given outside the bracket. A slight departure from the natural order is made in the case of *Youngia*, which, in order to conserve space, has been placed underneath rather than beside *Ixeris*.

A glance at this chart shows that the haploid numbers 8 and 9 are the most common in this group of genera. It is further evident that neither of these two numbers is definitely the more primitive. Both are found in the two primitive genera, and both occur in the most advanced subgenus of *Lactuca*. An analysis of the chromosome number and phylogenetic relationships within each genus and subgenus is therefore presented in order to determine as far as possible the relationship between the two basic numbers.

Dubyaea. The fact that both of the species examined of this most primitive genus have the basic number $n = 8$, suggests that this is the original basic number for the group as a whole. The cytological evidence supports the separation of these two species from *Crepis*, (Stebbins, 1937) as they are cytologically much nearer to *Prenanthes* subgenus *Nabalus*, and to some species of the subgenus *Mulgedium* of *Lactuca* than to any species of *Crepis*.

Prenanthes. The evidence from this genus supports that from *Dubyaea*, since the more primitive subgenus, *Nabalus*, has the haploid number 8, and the more advanced *Euprenanthes* has 9. The inclusion of *P. cacaliaefolia* in the same subgenus with *P. purpurea*, on the basis of the character of its involucre bracts, pappus, and achenes, is well supported by the cytological evidence.

Lactuca. This genus shows the greatest variation of any here studied in the degree of morphological specialization of its members. Although the haploid numbers 8 and 9 occur with about equal frequency, not only in the genus as a whole but in each of the larger subgenera as well, regardless of their phylogenetic position, within each subgenus there is some indication that the 8-paired condition is the more primitive. Among the 8-paired series there is a larger proportion of perennials, and of species with relatively few-headed inflorescences and large floral parts, while the types most highly specialized in the development of their inflorescences and in the reduction in number and size of their floral parts (*L. viminea*, *L. muralis*) as well as those species which show their recent origin by their aggressive, "weedy" tendencies (*L. Scariola*, *L. saligna*), all belong to the 9-paired series. Nevertheless, since the number 9 occurs among the more primitive species, and the transition from 8 to 9 has not yet been traced in any well defined phylogenetic sequence, there is a definite possibility that both numbers are original (the assumption of some degree of polyphyletic origin in the origin of this polymorphic genus does not seem improbable to the writers), and that in the later evolution of the genus the 9-paired species have been more successful than those with 8 pairs.

The consistent presence of the haploid number 17 in the American species of *Lactuca* is a remarkable situation, in view of the practical absence of polyploidy among the Old World species of the genus. The most logical assumption is that they are amphidiploids, and they are most probably descended from hybrids between 8- and 9-paired species. This hypothesis is quite compatible with the fact that representatives of both the subgenera *Mulgedium* and *Scariola* are included in this group, since 9- and 8-paired species occur in both subgenera, but suggests that the hybridization and

doubling must have occurred more than once. This suggestion is further supported by the distribution of the various Old World species to which the American ones are related. *L. spicata*, *L. villosa*, and *L. floridana* find their nearest relatives among the 8-paired species in *L. Marshallii*, *L. Bourgaei*, and other species of the Caucasus region and Asia Minor, while among the 9-paired species their nearest relative is *L. Raddeana* of eastern Asia. *L. graminifolia*, however, is most closely related to *L. capensis* and other African species, as well as to *L. tenerrima* of Spain, while *L. canadensis*, and *L. campestris* are nearest to *L. formosana* Maxim. of Eastern Asia, as well as to *L. indica* and *L. laciniata*. The conclusion is inescapable, therefore, that the diploid ancestors of the American species came to the New World from various parts of the Old, probably over different routes of migration. Since this is the case, the apparent absence of diploid species in this country is difficult to explain. One explanation is offered by the known behavior of a recently evolved amphidiploid species, *Spartina Townsendii* (Huskins, 1931) which has crowded out its diploid ancestors in the regions in which it occurs. That the polyploid American *Lactucas* could have done the same is amply demonstrated by their present behavior. *L. spicata* has much the widest range of any species of the subgenus *Mulgedium*, except for *L. sibirica* and *L. tatarica*, which belong to a different section of the subgenus, and is an aggressive, weedy species, very abundant in the recently glaciated areas of eastern North America. On the other hand, its Old World relatives are all relatively restricted in range, and are for the most part uncommon in the regions where they do occur, showing little or no tendency to spread. *L. canadensis* is, like *L. spicata*, a weedy type, although its Old World relatives are also widespread and common.

The polyploid nature of these American species of *Lactuca* affords a striking parallel to the situation in *Crepis*, in which genus the American species are likewise, with the exception of *C. nana* and *C. elegans*, all amphidiploids (Hollingshead and Babcock, 1931). Both cases confirm the postulate of Sax (1936), that polyploidy is most prevalent near the periphery of the range of a genus.

Youngia. The presence of the haploid number 8 in four of the five species of this genus that have been investigated, as well as the close resemblance between the chromosomes of *Y. stenoma* (Fig. 5a) and the two species of *Dubyaea* (Fig. 2) suggest that this genus has been differentiated from *Dubyaea* or its ancestors without much cytological change. Taxonomic evidence also supports this hypothesis for the origin of *Youngia* (cf. Babcock and Stebbins, 1937). The different basic number in *Y. tenuifolia* is as yet unexplained. In both

chromosome number and morphology, this species is nearer to *Crepis* than to the other species of *Youngia*, and as it is also somewhat intermediate taxonomically, the suggestion has been made that it arose through hybridization at a time when the differentiation of the two genera was less marked than at present (Babcock and Stebbins, 1937).

Ixeris. This genus has the basic haploid number 8 in half of the species studied. Since these species resemble *Youngia* in their chromosome morphology (cf. Hollingshead and Babcock, 1930, Fig. 23a and c), as well as in their external appearance and their geographic distribution, the logical hypothesis seems to be that the two groups have had a common origin from an 8-paired stock close to *Dubyaea*. A drawback to this hypothesis is that these 8-paired species of the subgenus *Euixeris* are the most advanced in the genus, and the 7-paired *I. alpicola*, as well as the 5-paired species of the subgenera *Paraixeris* and *Crepidiastrum* are in general more primitive in habit, floral characteristics, and distribution.

In the case of *I. alpicola* as well as *I. dentata*, which is apparently a polyploid derivative of the former (Okabe, 1932), a possible explanation is at hand. *I. alpicola* is quite similar in habit to the 7-paired species of *Crepis*, particularly *C. elegans*, and in floral characteristics the two species are not radically different, except that *C. elegans* has terete achenes with slender ribs, as is characteristic of *Crepis*, while *Ixeris alpicola* has somewhat compressed, strongly ribbed, subalate achenes, typical of *Ixeris*. Both species are alpine or subalpine in habitat. Since no other species of the Crepidinae, or at least none even remotely connected with this group, has the basic number seven, it is quite probable that the morphological and cytological resemblance between *Crepis flexuosa*, *C. elegans*, and *C. nana* to *Ixeris alpicola* indicates an actual relationship, and therefore a transition from *Ixeris* to *Crepis*.

The evidence from the phylogenetic position of both groups suggests that this transition is the result of intergeneric hybridization when the two genera were in a formative stage, a suggestion compatible with the chromosome number and morphology of the two groups. Furthermore this is more satisfactory from the point of view of their present geographic distribution than the hypothesis that the group represents the link through which *Ixeris* has been derived from *Crepis*, or vice versa.

The relationships of the 5-paired *Ixeris* species are equally difficult to understand. The hypothesis that they are the progenitors of the 8-paired *Euixeris* species is unlikely in view of the apparent connection between the latter and *Youngia* or *Dubyaea*. A genetic

connection with 5-paired *Crepis* species is unlikely on taxonomic grounds, as well as on the basis of their chromosome morphology, which is definitely *Ixeris*-like. An hypothesis concerning their origin will be presented below.

The presence of the same number and a similar morphology of the chromosomes in *Ixeris denticulata* subsp. *sonchifolia* as in subsp. *typica* does not support Nakai's (1920) opinion that this is a good species of the genus *Ixeris*, *sensu strictu*, and is cytological evidence for the merging of *Ixeris* and *Paraixeris*, as was done by one of us on taxonomic grounds (Stebbins, 1937). The bearing of the experiments of Ono and Satô (1935) on the relationships between the subgenera *Paraixeris* and *Crepidiastrum* has been discussed elsewhere (Stebbins, 1937).

II. Relationship of the group to *Crepis*

Since the primitive basic chromosome number for this group of genera is apparently $n = 8$, the relationship of this to the primitive number $n = 5$ in *Crepis* is of considerable importance to the phylogeny of the group. An hypothesis to explain the relationship between these numbers has already been presented by the senior author (Babcock, 1936 pp. 48-50), who suggested that the numbers 18 and 16 are the result of hybridization and amphidiploidy. The present work has produced some evidence in favor of this hypothesis, and some against it. These points may be summarized as follows:

1. The presence of two pairs of satellited chromosomes in *Dubyaea oligocephala* (Fig. 2a) removes the difficulty suggested by the senior author (1936, p. 50), and increases the possibility of amphiplasty as an explanation of the situation in the species which have only one satellited pair.

2. The interrelationships of the subgenera of *Ixeris* are most easily explained on this hypothesis. *Crepidiastrum* and *Paraixeris* could be considered primitive types in which the amphidiploidy had not taken place, while the *Euixeris* species could be thought of as resulting from crossing between these and the ancestors of *Youngia*, in which amphidiploidy had not yet taken place.

Against the hypothesis are the following points:

1. The primitive nature of both *Dubyaea* and *Prenanthes* requires that their 4-paired ancestors be more primitive and much older than any 4-paired species of *Crepis*, or of any other genus of the Cichorieae whose number is now known.

2. The greater frequency of the haploid number 8 among these species does not agree with expectation, since in *Crepis* 5-paired species are in general more primitive than those with 4 pairs, and hence 9-paired species, presumably originating by doubling of 5 and

4, should be more primitive than those with 8 pairs. This difficulty could, however, be overcome by assuming that the 9-paired species have become more successful in evolution, and hence have produced more advanced types, which have crowded out their primitive ancestors.

3. Except for the presence of two pairs of satellited chromosomes in *Dubyaea oligocephala*, the chromosome complement of that genus, as well as of *Prenanthes* and the more primitive species of *Lactuca* and *Youngia*, does not resemble a *Crepis* complement duplicated. There is a much higher proportion of medianly constricted chromosomes in these than there is in *Crepis*. This discrepancy could be accounted for in two ways:

A. The original ancestors of *Dubyaea*, *Prenanthes*, and *Lactuca* may have had a large proportion of subterminally constricted chromosomes, which have acquired median constrictions through translocations. This is improbable, first because of the great similarity in chromosome morphology of such distantly related species as *Youngia stenoma*, *Dubyaea oligocephala*, and *Prenanthes trifoliolata*, a fact which indicates that slight rather than great structural changes have taken place in the evolution of these species from their common ancestors; and second, because the evolutionary tendency in *Lactuca* has been from median toward subterminal constrictions, as is pointed out below, and hence the evolution of the original *Lactuca* complement from that of its ancestors would have to be of just the reverse type from that which can be traced within the genus, a course which seems rather improbable.

B. The common ancestors of *Dubyaea*, *Prenanthes*, and *Crepis* may have had 4 or 5 pairs of medianly constricted chromosomes, which became subterminally constricted through translocations in the stock which evolved toward *Crepis*, and remained in their original condition in the amphidiploid stock which produced the other genera. The likelihood of this explanation rests on the discovery of species of the Cichorieae which are more primitive than any of these here considered, and which have four or five pairs of medianly constricted chromosomes, or on the postulate that a series of such species formerly existed, but are now extinct. Hence, until such species are discovered, the amphidiploid origin for these 9- and 8-paired species must remain hypothetical.

An alternative hypothesis suggests itself in the light of the evidence presented in this paper. The haploid number 8 may be the most primitive one for the subtribe Crepidinae, and the lower numbers derived from it by a gradual process of reduction. This process has evidently taken place in the more advanced species of *Crepis*

(Hollingshead and Babcock, 1930), and in the Gramineae (Avdulov, 1931), Polygonaceae (Jaretzky, 1928), Cruciferae (Manton, 1932), and other groups, while evidence of one way in which it could take place has been presented by Navashin and Gerassimova (1935). If this were true, then the other primitive species of the Cichorieae should share with *Dubyaea* and *Prenanthes* the numbers 16 and 18. In particular, species of the subtribe Leontodontinae should be found with 8 or 9 pairs of chromosomes. In this subtribe, which is characterized by a pappus more primitive than that of the Crepidinae, three genera are known to contain 5- or 4-paired species, i.e., *Leontodon*, *Picris* (Bergman, 1935), and *Hypochaeris* (unpublished counts of the writers). Hence a more complete survey of chromosome number and morphology in the Cichorieae as a whole should throw definite light on the probability of either one of these alternative hypotheses.

III. Chromosome size and phylogeny

The reduction in chromosome size with advancing evolution was first postulated by Delaunay (1926) and was noted in *Crepis* by the senior author (Babcock and Cameron, 1934). In the present material there are several cases which parallel those already known in *Crepis*:

(1) The three primitive subgenera of *Lactuca*; *Mulgedium*, *Sororia*, and *Lactucopsis*, have, on the average, definitely larger chromosomes than the more specialized subgenera; *Mycelis*, *Phaenixopus*, and *Scariola*.

(2) *L. muralis*, which has small flower-heads and large panicles, and is definitely specialized, has strikingly smaller chromosomes than the species of *Lactucopsis* from which it is probably derived.

(3) *L. tenerrima* and *L. leptcephala*, both with very small chromosomes, are relatively reduced and specialized as compared to their relatives with larger chromosomes, *L. perennis*, *L. tuberosa* and *L. cretica*.

(4) *Youngia stenoma* and *Y. depressa* (at least the plant grown as this species) both have relatively large chromosomes and both belong to the primitive sections of the genus (Babcock and Stebbins, 1937). *Y. paleacea* is intermediate in both chromosome size and phylogenetic position. *Y. japonica*, with the smallest chromosomes (Hollingshead and Babcock, 1930, Fig. 23c) is the most advanced species of this genus.

(5) *Ixeris dentata* and *I. alpicola*, the most primitive species of the subgenus *Euixeris*, have large chromosomes, while the specialized, reduced species such as *I. graminea*, *I. polycephala* and *I. stolonifera* have very small chromosomes.

However, there are certain apparent exceptions to this hypothesis:

(1) *Prenanthes cacaliaefolia* is more advanced, but has definitely larger chromosomes than the species of *Nabalus* and of the primitive genus *Dubyaea*.

(2) *L. rostrata*, although its achenes are relatively unspecialized, has large panicles of small, few-flowered heads and specialized calyculate involucre along with the largest chromosomes yet known in *Lactuca*.

These exceptions may indicate that phylogenetic increase in size occasionally takes place in the Crepidinae, although as yet no hypothesis concerning it can be formed without a more detailed cytological study of those species which form the connecting links between the ones here mentioned and other subgenera of *Lactuca* and *Prenanthes*.

Increase in chromosome size with advancing evolution has been postulated by Avdulov (1931) for the Gramineae, and connected by him with a progressive cooling of the climate during the evolution of those species with large chromosomes. This connection cannot, however, be applied to the species of *Prenanthes* and *Lactuca* here in question. *Prenanthes cacaliaefolia* grows under climatic conditions quite similar to those in the regions inhabited by the members of the subgenus *Nabalus*, while *Lactuca rostrata* is one of the few species of its genus found in the tropics. Of the other two tropical species of *Lactuca* which have been studied, one, *L. leptcephala*, has small chromosomes and the other, *L. Schulzeana*, large ones, so that in *Lactuca* and *Prenanthes* there is apparently no significant correlation between chromosome size and geographic distribution.

IV. Chromosome morphology and phylogeny

The fact that taxonomic relationship is usually accompanied by similarity in chromosome morphology has been amply demonstrated in *Crepis* (Hollingshead and Babcock, 1930, Babcock and Cameron, 1934), *Allium* (Levan, 1935), and other genera. Therefore a study of the chromosome morphology of a group of related species should throw light not only on their connections to each other, but also on the type of changes in chromosome morphology that occur with advancing evolution. Such a study in the group here under consideration has led to the following observations:

1. Among the more primitive species there is a striking similarity in both the size and morphology of the chromosomes, even where they belong to different genera, while among those more advanced, there may be considerable differences even within the same subgenus. Thus the complements of the two species of *Dubyaea*, of the two primitive species of *Youngia*, and of all the species of *Prenanthes*, subgenus *Nabalus*, are essentially similar, while there are considerable differences in *Lactuca* within a single subgenus, such as

Scariola. Although, as is very evident from the study of genera in which translocations are common, such as *Datura* (Blakeslee, 1932), *Oenothera*, and others, similarity in external morphology of the chromosome complement does not necessarily mean structural similarity, nevertheless the uniformity among the primitive species of this group of the Crepidinae suggests that less structural differentiation of the chromosomes has occurred in the differentiation of the primitive species of this group than in the more advanced ones. This suggests that in the relatively primitive groups of the Crepidinae the differentiation of genera has been accompanied by fewer changes in the gross morphology and structure of the chromosomes than has accompanied the evolution of individual species or species groups in the more advanced, larger and more diversified genera.

2. The hypothesis of Levitzky (1931), also suggested by Levan (1935), that primitive types tend to have chromosome sets of which the members are all of about the same size, and which all possess median, or nearly median constrictions, and that with advancing evolution the chromosomes become more unequal in size, and tend to become subterminally constricted, is well supported by the present study. All of the primitive subgenera of this group have chromosome complements primitive in this respect, with the exception of the subgenera *Crepidiastrum* and *Paraixeris* of *Ixeris*, and *Mulgedium* in *Lactuca*. On the other hand, such specialized species as *L. muralis* and *L. viminea* have not only considerable inequality in size among their chromosomes, but possess a considerable proportion of subterminally constricted chromosomes. Within the most advanced subgenus, *Scariola*, *L. perennis* retains a relatively primitive genom (Fig. 4e), along with primitive characteristics of external morphology. *L. cretica*, a somewhat xerophytic species with specialized tuberous roots and unusually long filiform beaks 2–3 times the length of its achenes, has predominantly subterminally constricted chromosomes (Fig. 4d), while the three modern, weedy species, *L. Scariola*, *L. virosa*, and *L. saligna*, all have chromosomes very unequal in size, and with a majority of subterminal or submedian constrictions.

A striking contrast to this correlation is afforded by *Crepis*, in which the hypothesis of Levitzky holds only to a very limited extent. For instance, *C. conyzaeifolia*, a primitive species of the subgenus *Catonia*, has a complement very similar to that of *C. myriocephala* and other highly specialized species of the subgenus *Barkhausia* (Babcock and Cameron, 1934, Figs. 7 and 17). This difference between *Crepis* and these other genera of the Crepidinae may be explained on Levan's hypothesis, that this change from median to subterminal constrictions is the result of unequal translocation. If all

of the chromosomes of a set are equal in size and medianly constricted, as in *Dubyaea*, *Nabalus*, and *Youngia*, any unequal translocation must produce greater inequality and fewer median constrictions, while if the chromosomes are very unequal in size and all are subterminally constricted, unequal translocations can produce an equalization in size, and medianly constricted chromosomes; or if confined to the long arms, will have relatively little effect. These facts have been demonstrated by the experiments of Levan (1935) and Navashin and Gerassimova (1935). Levan, working with two species of *Allium* whose chromosomes were nearly equal in size and had mostly median constrictions, found that the majority of the translocations obtained resulted in chromosomes of unequal size and with more subterminal constrictions. Navashin and Gerassimova found that new chromosomes produced by translocation in *Crepis capillaris* and *C. tectorum*, species with mostly subterminally constricted chromosomes, were most often medianly constricted, and homozygous races produced in this manner by Gerassimova (1935), would, on Levitzky's hypothesis, be considered more primitive than the original *tectorum* stock.

On this basis, the prevalent genom of *Crepis* must be considered to have more altered chromosomes than those of *Dubyaea* and *Prenanthes*, an hypothesis in keeping with the relatively advanced phylogenetic position of *Crepis* in relation to these other two genera. In this regard, it is perhaps significant that three of the most primitive species of *Crepis*, *C. sibirica*, *C. paludosa*, and *C. albida*, have a greater proportion of medianly constricted chromosomes than almost all of the others (Babcock and Cameron, 1934, Figs. 6 and 16).

An objection to Levan's hypothesis is found in the observation of Navashin and Gerassimova (1935), that small chromosomes and short arms of chromosomes act most often as recipients of translocations produced in *Crepis* by aging of seeds, and hence a progressively greater inequality in the size of the chromosomes and chromosome arms might not be attained by this method. The hypothesis of Levitzky (1931), that the inequality is evolved by the progressive accumulation of deficiencies, has as yet no evidence to support it, and the facts presented in the present paper provide no method of judging the validity of either hypothesis.

Summary and Conclusions

1. The chromosome numbers of nine species of *Prenanthes*, twenty-five of *Lactuca*, two each of *Dubyaea* and *Youngia*, one of *Cephalorrhynchus*, and two subspecies and a variety of *Ixeris* are here reported for the first time.

2. The somatic numbers 16 and 32 are found in *Prenanthes*, subgenus *Nabalus*, 18 in the subgenus *Euprenanthes*, 16 in the genus *Dubya*, 16, 18, 34 and 36 in the various subgenera of *Lactuca*, 18 in *Cephalorrhynchus*, and 16 in the species of *Youngia* reported in this paper.

3. 16 is probably the more primitive diploid number in *Prenanthes*, *Dubya* and *Youngia*. In *Lactuca* more of the primitive species have this number, while more of the advanced species have 18 chromosomes, but the two numbers may both have existed since the formation of the genus.

4. The American species of *Lactuca* here studied are amphidiploids with the somatic number 34. They are probably derived from crossing between 16 and 18 chromosome species, with subsequent doubling of the chromosome complement. This hybridization and doubling must have occurred more than once.

5. The chromosome number and morphology of the Chinese subspecies of *Ixeris denticulata* supports the taxonomic evidence that the genera *Ixeris* and *Paraixeris* should be merged.

6. The hypothesis of an amphidiploid origin for the numbers 16 and 18 in these genera is possible only if species of the Cichorieae are found with a somatic complement of 8 or 10 mostly medianly constricted chromosomes, or the existence of a series of such species in the past is assumed. An alternative to this hypothesis is that 16 and 18 are primitive numbers for the Crepidinae, and 10 and 8 are derived from them by reduction.

7. The hypothesis that reduction in absolute size of the chromosomes often accompanies evolutionary advancement is borne out by the study of these genera, although exceptions are found in *Prenanthes*, subgenus *Euprenanthes*, and *Lactuca*, subgenus *Sororia*.

8. The hypothesis that primitive species have many chromosomes with median constrictions, and have the chromosomes of a set nearly equal in size, and that with advancing evolution subterminal constrictions are evolved and the chromosomes of a set become unequal in size is borne out by this study. It is further suggested that in this group the original differentiation of genera was accompanied by less structural alteration of the chromosomes than was the evolution of species groups among the more highly evolved and diversified subgenera.

Literature Cited

- Avdulov, N. P. 1931. Karyo-systematische Untersuchungen der Familie Gramineen. Bull. Appl. Bot., Suppl. 44: 428 pp.
- Babcock, E. B. 1936. The origin of *Crepis* and related genera with particular reference to distribution and chromosome relationships. Essays in Geobotany in honor of William Albert Satchell: 9-53.
- and Navashin, M. 1930. The genus *Crepis*. Bibliographia Genetica 6: 1-90.

- Babcock, E. B. and Cameron, D. 1934. Chromosomes and phylogeny in *Crepis* II. The relationships of one hundred eight species. Univ. Calif. Publ. Agr. Sci. 6: 287-324.
- and Stebbins, G. L. Jr., 1937. A monograph of the genus *Youngia*. Publ. No. 484, Carnegie Inst. Wash. (in press).
- Bergman, B. 1935. Zytologische Studien über die Fortpflanzung bei den Gattungen *Leontodon* und *Picris*. Svensk. Bot. Tidskr. 29: 155-301.
- Blakeslee, A. F. 1932. The species problem in *Datura*. Proc. Sixth Int. Cong. Genetics 1: 104-120.
- Delaunay, L. 1926. Phylogenetische Chromosomenverkürzung. Zeitschr. Zellf.-mikr. Anat. 4: 338-364.
- Gates, R. R., and Rees, E. M. 1921. A cytological study of pollen development in *Lactuca*. Ann. Bot. 35: 365-398.
- Gerassimova, H. 1935. The nature and causes of mutations II. Transmission of mutations arising in aged seeds: occurrence of homozygous dislocants among progeny of plants raised from aged seeds. Cytologia 6: 431-437.
- Heitz, E. 1929. Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. Ber. Deu. bot. Ges. 47: 274-284.
- Hollingshead, L., and Babcock, E. B. 1930. Chromosomes and phylogeny in *Crepis*. Univ. Calif. Publ. Agr. Sci. 6: 1-53.
- Huskins, C. L. 1931. The origin of *Spartina Townsendii*. Genetica 12: 531-538.
- Ishikawa, M. 1921. The chromosomes of *Lactuca*. Bot. Mag. (Tokyo) 35: (153). Japanese.
- Jaretsky, R. 1923. Histologische und karyologische Studien an Polygonaceae. Jahrb. f. wiss. Bot. 69: 357-490.
- Kitamura, S. 1935. *Ixerides Japonicae*. Bot. Mag. (Tokyo) 49: 280-297.
- Levan, A. 1935. Cytological studies in *Allium* VI. The chromosome morphology of some diploid species of *Allium*. Hereditas 20: 289-330.
- Levitzky, G. A. 1931. The karyotype in systematics. Bull. Appl. Bot. Pl. Breed., (U.S.S.R.) 27: 220-240.
- Manton, I. 1932. Introduction to the general cytology of the Cruciferae. Ann. Bot. 46: 509-556.
- Marchal, E. 1920. Recherches sur les variations numériques des chromosomes dans la série végétale. Mém. Acad. Roy. Belg., II Series, I. IV, 8: 1-108.
- Müntzing, A. 1932. Apomictic and sexual seed formation in *Poa*. Hereditas 17: 131-154.
- Nakai, T. 1920. Notulae ad plantas Japoniae et Koreae, XXIII. Bot. Mag. (Tokyo) 34: 141-158.
- Navashin, M., and Gerassimova, H. 1935. The nature and causes of mutations I. On the nature and importance of chromosome mutations taking place in resting plant embryo due to their aging. Biologicheskii Zhurnal (Moscow) 4, ed. 4: 593-634.
- Okabe, S. 1932. Parthenogenesis bei *Ixeris dentata*. Bot. Mag. (Tokyo) 46: (518). Japanese, with German summary.
- Ono, H. kaj Satô, D. 1935. Intergenra hibridigo en Cichorieae, II. Hibridoj de *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* kaj *Paraiixeris denticulata*. Jap. Jour. Genet. 11: 169-179.
- Randolph, L. F. 1935. A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. Stain Technology. 10: 95-96.
- Sax, K. 1936. The experimental production of polyploidy. Jour. Arnold Arboretum 17: 153-159.
- Smith, F. H. 1934. The use of picric acid with the gram stain in plant cytology. Stain Technology. 9: 95-96.
- Stebbins, G. L. Jr. 1937. Nomenclatorial changes in *Lactuca* and related genera. Jour. Bot. (London) (in press).
- 1936. Two new species of *Lactuca* from tropical Africa. Bull. Jard. Bot. de l'Etat, Bruxelles 14: 223-226.
- Stockwell, P. 1934. A stain for difficult plant material. Science, N. S. 80: 121-122.
- Tahara, M. 1910. Über die Zahl der Chromosomen von *Crepis japonica* Benth. Bot. Mag. (Tokyo) 24: 23-27.
- Tischler, G. 1936. Pflanzliche Chromosomen-Zahlen, Nachtr. 2, II. Tabulae Biol. Per. 6: 57-115.

Polyploidy From Twin Seedlings

By

Arne Müntzing

Svalöf, Sweden

1. Introduction

Recently two Japanese scientists, NAMIKAWA and KAWAKAMI (1934), have briefly reported some rather interesting results concerning the chromosome numbers of twin seedlings in wheat. In crosses between varieties of *Triticum vulgare* the occurrence of twin seedlings was observed. The chromosome numbers of these twin plants were determined and in some cases were found to differ from the normal number. Of a total of 29 twin pairs studied, 19 were found to be normal in chromosome number, both twins in each pair having $2n = 42$. In 10 cases, however, the twins had different chromosome numbers, one member of the pair generally having $2n = 63$, the other one $2n = 42$. This was found in eight cases. In another two pairs the chromosome numbers of the twin plants were $42 - 21$ and $42 - 84$ respectively. Consequently, by selection of twin plants NAMIKAWA and KAWAKAMI, in a rather limited material, succeeded in obtaining wheat plants with 21, 63 and 84 chromosomes, besides normal plants with $2n = 42$.

Being occupied with problems of polyploidy, especially in cultivated plants, the present writer decided to repeat, if possible, the work of NAMIKAWA and KAWAKAMI. Further, as selection of polyploids from twin plants might be possible also in other cultivated plants than wheat, the work was also extended to include other cereals and different species of forage crop plants, etc.

The twin material studied was in part produced from germination experiments of our own, performed in the laboratory of the cyto-genetic department at Svalöf. Seeds of winter wheat and rye were germinated (between moist blotting paper) in the autumn of 1935, summer wheat, barley and oats in the spring of 1936. Most of the material, however, was obtained from the seed control stations at Svalöf and Åkarp, Sweden. For this material I am very much indebted to Dr. H. CHRISTOFFERSSON, Dr. O. TEDIN and Mr. A. GÄRSNER. From these gentlemen I learned that twin seedlings are not infrequently met with during seed control work. Collections of twin seedlings of wheat, oats and barley had even been brought together and preserved by Dr. CHRISTOFFERSSON. In view of this

information the possibility of obtaining twin plants in various species of cultivated plants seemed to be rather promising, and during the winter of 1935-1936 rather large numbers of twin seedlings were in fact obtained from the seed control stations mentioned.

The twin plants received were separated from each other at an early stage, simply by cutting the two plants apart with the aid of a sharp knife. After separation, each plant was placed in a separate pot, and root tips were fixed in chrom-acetic formalin. As most of the plants were received during the winter time they were kept growing under electric light, the installation of electric light for winter cultures, available at Svalöf, being utilized for that purpose.

2. The frequency of twin plants

Up to now twin seedlings have been obtained from the following species: *Triticum vulgare*, (winter and summer wheat), *Triticum turgidum*, *Secale cereale*, (winter and summer rye), *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Agrostis stolonifera*, *Festuca pratensis*, *Festuca ovina*, *Festuca rubra*, *Festuca duriuscula*, *Cynosurus cristatus*, *Medicago sativa*, *Trifolium pratense*, *Beta vulgaris*, *Daucus carota* and *Solanum tuberosum*.

The ratio of normal: twin seedlings could not be calculated this year for the material coming from the seed control stations, but data are available from our own germinations. These, however, only include the cereals, wheat, rye, barley and oats. The frequency of twin seedlings in this material is given in Table 1.

In *Linum*, KAPPERT (1933) found that strains producing a high proportion of twin seedlings could be selected in the progeny of crosses between parent strains, giving a low frequency. Further, as the twin seedlings of wheat, studied by NAMIKAWA and KAWAKAMI (l.c.), were found in F_3 - and F_4 -progenies of certain intervarietal crosses, a similar heterozygous material of winter wheat was kindly placed at my disposal by Prof. Å. ÅKERMAN, Svalöf. This material consisted of seeds from F_2 -, F_3 -, F_4 -, F_5 - and F_6 -progenies of different crosses between varieties of *Triticum vulgare*. For comparison seeds of the commercial variety "Skandia"-wheat, which may be considered to be completely or almost completely homozygous, were also germinated.

As is evident from Table 1 there is no significant difference between the percentage of twin seedlings in the homozygous and heterozygous material. In both categories the frequency is low, approximately one twin pair being obtained from one thousand seeds. The exact values are $0,89 \pm 0,27$ per mille for Skandia-wheat and

0,99 \pm 0,21 per mille for the F₂-F₆ material. A comparison between the frequency of twin seedlings in the different generations

Table 1. The frequency of twin seedlings in some cereals

Species	Field number or commercial variety	Number of seeds	Number of twin pairs	Twin pairs per mille
<i>Triticum vulgare</i> winter wheat	Skandia	12,305	11	
"	1057 (F ₂)	3,064	5	
"	1058 (F ₂)	1,244	4	
"	1059 (F ₂)	1,225	1	
"	1062 (F ₂)	1,558	0	
"	1063 (F ₂)	1,550	2	
"	1064 (F ₂)	711	1	
"	1061 (F ₃)	1,588	0	
"	1081 (F ₃)	2,246	0	
"	1083 (F ₃)	3,072	2	
"	1085 (F ₃)	1,525	1	
"	1073 (F ₄)	1,200	2	
"	1080 (F ₄)	1,457	3	
"	1069 (F ₅)	1,369	1	
"	1086 (F ₆)	1,336	1	
<i>Triticum vulgare</i> summer wheat	Fylgia	2,490	1	
"	Diamant	2,700	3	
"	Extra Kolben III	2,050	1	
"	"Värvete"	1,720	1	
<i>Triticum vulgare</i> total		44,410	40	0,90 \pm 0,14
<i>Triticum turgidum</i>	2,210	18,856	3	0,16 \pm 0,09
<i>Secale cereale</i>	Kungsråg	10,308	6	
"	Stålag	6,667	19	
"	0305	389	0	
<i>Secale cereale</i> total		17,364	25	1,44 \pm 0,29
<i>Avena sativa</i>	Orion	2,050	0	
"	Sege	3,250	0	
"	Orn	500	0	
"	Gullregn II	3,150	0	
"	Stormogul II	3,610	1	
"	"Havre"	821	0	
<i>Avena sativa</i> total		13,381	1	0,07 \pm 0,07
<i>Hordeum vulgare</i>	Gullkorn	1,900	0	
"	2 III	17,113	0	
"	Kenia	4,033	1	
"	Brio	5,653	1	
"	Maja	1,975	1	
"	Sege \times Binder	2,100	2	
"	Vega	4,450	1	
"	Opal	4,281	1	
<i>Hordeum vulgare</i> total		41,505	7	0,17 \pm 0,06

($F_2 - F_6$) of the latter material did not reveal any significant differences either.

In *summer wheat* a similar frequency of twin seedlings as in winter wheat was obtained, 8960 seeds from four different commercial varieties giving 6 twin pairs. If all data for *Triticum vulgare* are added, the resulting figures will be 44410 seeds and 40 twin pairs. This gives a frequency value of $0,90 \pm 0,14$ per mille.

In *Triticum turgidum* only 3 seeds out of 18856 gave twin plants, which corresponds to the value $0,16 \pm 0,09$ per mille. This value is much lower than that found for *Triticum vulgare* ($0,90 \pm 0,14$), and, evidently, the difference is statistically significant.

In *rye* three different commercial varieties were tested. A similar or slightly higher percentage was found, 25 twin pairs being obtained from 17364 seeds. This corresponds to $1,44 \pm 0,29$ per mille. The variety "Stålråg" gives a higher proportion of twins than "Kungsråg", the difference being significant ($D/m = 3,78$).

Also in *barley* and *oats* a low proportion of twin seedlings was obtained from germination experiments with a number of commercial varieties (cf. Table 1). The average values were found to be $0,17 \pm 0,06$ per mille in barley and $0,07 \pm 0,07$ in oats.

Oats and barley thus seem to give a lower proportion of twin seedlings than *Triticum vulgare* and rye, the data hitherto accumulated demonstrating significant differences. The main point, however, is the fact that all the cereals tested have given quite a low proportion of twin seedlings, generally less than one twin pair per mille being obtained.

3. Chromosome counts

The entire twin material obtained from the seed control stations and from our own germinations has not yet been completely investigated as to the chromosome numbers. However, the data hitherto accumulated (cf. Table 2) are sufficient to show that *selection of twin seedlings is an important method of obtaining heteroploid plants not only in wheat but also in several other species*. The results may be given under the following two headings: A) species in which all the twins had the same chromosome number and B) species in which some twins had deviating chromosome numbers.

A. Species in which all twin plants had the same chromosome number

a) *Dactylis*

In *Dactylis glomerata* the chromosome number was found to be 28 or ± 28 in each member of 40 twin pairs. In seven cases one of the twins in each pair had died before fixation but the remaining

single plants all had ± 28 chromosomes, which is the normal number of the species.

b) *Hordeum*

In barley all the members of seven complete pairs had $2n = 14$, just as four single plants, of which the corresponding twins had died at an early stage. One single plant of the same category had tetraploid sectors in some roots but died before a re-investigation could be made. Tetraploid sectors in root tips are frequent after heat treatment (unpublished results) and may even occur spontaneously in exceptional cases. Probably the sectors found in the plant mentioned had nothing to do with its origin as a twin seedling.

c) *Festuca*

Four complete pairs and one single plant of *Festuca pratensis* had all the normal chromosome number $2n = 14$. One pair and two single plants of *Festuca ovina* had $2n = 42$ and one pair of *Festuca rubra* $2n = \pm 56$. A single twin plant from another biotype of the same species had $2n = 42$.

d) *Scattered observations from other genera*

In the following species all twin plants studied had also unchanged chromosome numbers: *Agrostis stolonifera*, $2n = \pm 42$, (4 pairs, 1 single twin plant); *Cynosurus cristatus*, $2n = 14$, (1 pair, 1 single plant); *Beta vulgaris*, $2n = 18$, (1 triplet, 1 pair and 2 single twin plants).

B. Species in which heteroploid twin plants were found

a) *Triticum*

As the results of NAMIKAWA and KAWAKAMI (1934) in wheat was the direct cause of the present investigation, it seemed desirable in the first place to procure twin material of *Triticum vulgare*. Such twins were in fact obtained in the autumn of 1935, in part from germination experiments of our own, in part from the seed control stations. Unfortunately, however, these winter wheat twins were obtained rather late in the season, and therefore mortality among this material was very high. About half of the twin plants of *T. vulgare* did not survive the winter, though they were growing in boxes, placed in a hot-bed. Only part of the material could be fixed in the autumn. The chromosome numbers of the remaining individuals were determined in the spring and summer of 1936. Data are available for 19 complete pairs and 20 single plants. Of these 58 plants not less than 57 had the normal chromosome number 42, but one twin plant was found to have $2n = \pm 63$. This plant, however, died during the winter. Nevertheless, the occurrence of this

single plant is sufficient to confirm the main result of NAMIKAWA and KAWAKAMI, viz. that individuals with deviating chromosome numbers may be found among twin seedlings of wheat.

The frequency in our case seems to be lower. This, however, may be apparent only, since mortality in our material was high and the twins from the same seed generally differ markedly in vigour. As will be further shown below the seedlings with deviating chromosome numbers are generally found among the weaker members of the twin pairs (cf. fig. 5 in the paper by NAMIKAWA and KAWAKAMI). Consequently mortality will be selective and tend to decrease the number of plants with deviating chromosome numbers.

Twin seedlings of *Triticum vulgare* were also obtained in summer wheat, but chromosome counts could only be made as regards two complete pairs and five single plants. All these nine plants had the normal number 42. Of the twin partners of the five single plants mentioned, one had died before fixation. With regard to the other four the root tip fixations were unsuccessful, no countable chromosome plates being present. However, at least one of these four plants, of which the chromosome numbers are not known, must have a deviating chromosome number. Judging from its reduced fertility and slightly deviating morphology this plant is most probably another 63-chromosome individual. This will be settled by chromosome counts of the progeny.

In *Triticum turgidum* three twin pairs were produced from a total of 18856 seeds. Fortunately all six twin plants survived the winter and could be examined cytologically. The result of this examination was interesting. In one of the pairs both plants had 28 chromosomes but in each of the other two pairs one twin had $2n = 28$, the other one $2n = 42$ (Fig. 1). This result definitely shows that also in other *Triticum* species than *vulgare*, twin seedlings with deviating chromosome numbers may be formed.

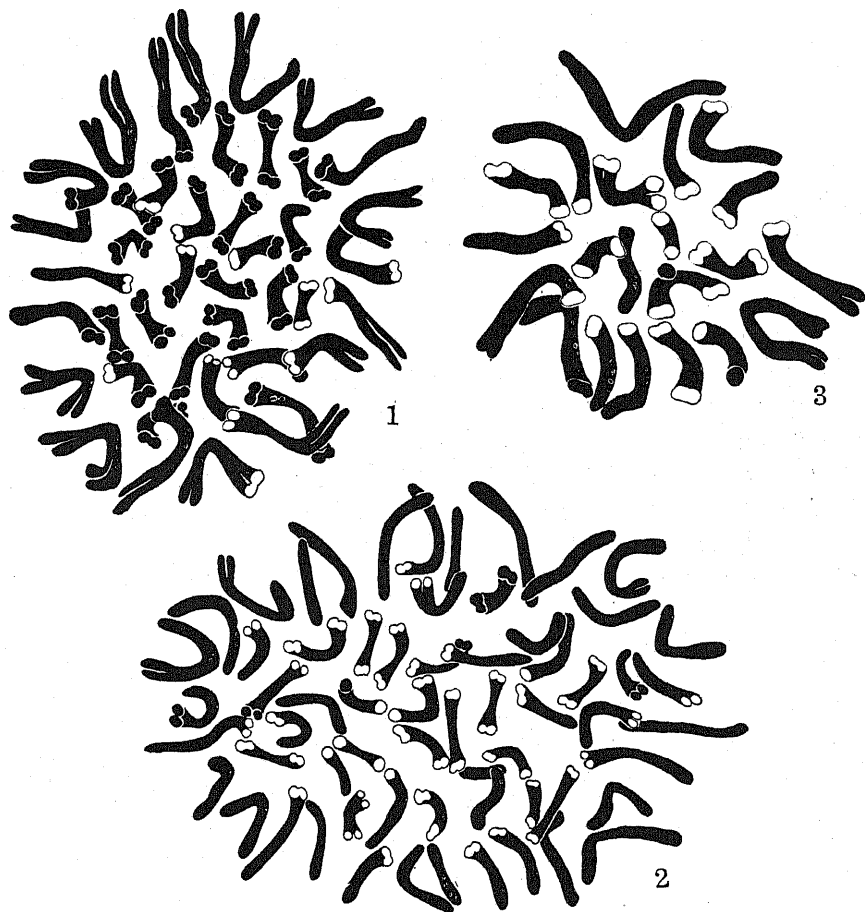
b) *Secale*

In rye 17 twin pairs and 10 single twin plants were available for cytological examination. In addition there was also a group of three plants, originating from the same seed, which consequently were triplets. In the entire material, consisting of 47 plants, there was one individual with a deviating chromosome number. This plant proved to be *triploid* ($2n = 21$, Fig. 3) while all the other plants had, as usual, 14 chromosomes.

c) *Avena*

In *Avena sativa* not less than four twin plants with deviating chromosome numbers were found among 16 twin pairs and 2 single

twin plants. These four plants all had $2n = \pm 63$ (Fig. 2) while the corresponding twins and the rest of the material were hexaploid as usual ($2n = 42$).



Figs. 1-3. Somatic plates of twin seedlings with deviating chromosome numbers. 1. *Triticum turgidum* ($2n = 42$). 2. *Avena sativa* ($2n = 63$). 3. *Secale cereale* ($2n = 21$).

d) *Phleum*

In *Phleum pratense* a relatively large number of twins were investigated, the material available consisting of 45 pairs and 20 single twins. Four plants with deviating chromosome numbers were obtained, three plants having $2n = \pm 63$ and the fourth $2n = 21$. All the other individuals had ± 42 chromosomes, which is the normal chromosome number of timothy. The appearance of a haploid timothy plant is especially noteworthy. This plant and a similar individual in *Solanum tuberosum* (cf. below) are the only haploids hitherto obtained in our entire twin material.

Table 2. The frequency of twin plants with deviating chromosome numbers

Species	Number of twin plants examined	Number of twins with deviating chromosome numbers	Percentage of deviating twins
<i>Triticum vulgare</i>	67	1	1
" <i>turgidum</i>	6	2	33
<i>Secale cereale</i>	47	1	2
<i>Avena sativa</i>	34	4	12
<i>Hordeum vulgare</i>	19	—	0
<i>Phleum pratense</i>	110	4	4
<i>Dactylis glomerata</i>	87	—	0
<i>Festuca pratensis</i>	9	—	0
" <i>ovina</i>	4	—	0
" <i>rubra</i>	3	—	0
<i>Lolium perenne</i>	38	2	5
<i>Agrostis stolonifera</i>	9	—	0
<i>Cynosurus cristatus</i>	3	—	0
<i>Poa pratensis</i>	56	10	18
<i>Solanum tuberosum</i>	4	1	25
Total	496	25	5

e) *Poa*

The observations in the genus *Poa* are so far limited to *Poa pratensis*. In this species the frequency of twins with deviating chromosome numbers seems to be unusually high. A total of 19 pairs, one triplet and 15 single twin plants comprised not less than 10 plants with deviating chromosome numbers. As demonstrated in a previous publication (MÜNTZING 1932) *Poa pratensis* is apomictic and very polymorphic. Different biotypes of the species have generally different, and aneuploid, chromosome numbers, which in the main range from about 50–100 (MÜNTZING 1932 and unpublished results, RANCKEN 1934, ÅKERBERG 1936).

The twin material now studied also belonged to different biotypes, differing in chromosome number. As the numbers are relatively high they have not yet been exactly determined and may need future correction to some extent. This is also the case with respect to those twin plants which have clearly deviating chromosome numbers. In the main, however, the following situation was met with:

In one variety ("3003") 12 of the examined plants had $2n = \pm 48$. Four plants, however, had clearly different numbers, viz. $2n = \pm 78$, ± 72 , ± 71 and ± 62 respectively. In the next variety ("3009") 18 individuals had approximately 68 chromosomes, but one individual had $2n = \pm 100$. In the variety "3019" only 5 plants have hitherto been examined and these had all $2n = \pm 69$. In a fourth variety, however, clearly deviating individuals were again met with. Four plants had approximately 76, 80, 65 and 72, chromosomes respectively, while the remaining four plants had $2n = \pm 52$. In a fifth

variety ("3645") again, five plants had ± 51 chromosomes, but one plant had $2n = \pm 72$.

Owing to the intraspecific chromosome variation the state of things in *Poa pratensis* is less clear than in the other genera studied, but nevertheless it is evident that in the main the twins of *Poa pratensis* behave in the same way. Usually the members of a twin pair have the same chromosome number, but relatively often one of the twins is approximately triploid in comparison with the other one. Of the ten plants, which were found to have deviating chromosome numbers, two were now single plants, the corresponding twins of which had died at an early stage. The remaining eight plants, however, belonged to six twin pairs and to one triplet, in which the chromosome numbers of all the members had been examined. In the triplet, two of the plants had the normal number ± 48 , the third plant had ± 71 . In five of the six twin pairs one member of the pair had the normal number of the strain, the other member being approximately triploid (in comparison with the normal number). Thus the following numbers were found: $\pm 48 - \pm 78$, $\pm 49 - \pm 72$, $\pm 52 - \pm 76$, $\pm 52 - \pm 72$ and $\pm 68 - \pm 100$. Finally, in the sixth pair the plants were found to have ± 65 and ± 80 chromosomes. Both these values are higher than the normal number of the strain (± 52).

f) *Lolium*

In perennial rye-grass, *Lolium perenne*, two plants with deviating chromosome number were found among 15 pairs, one triplet and 5 single plants. The two deviating plants were both triploid ($2n = 21$) while the normal number of *Lolium perenne* ($2n = 14$) was found in the rest of the material. It should be emphasized that, contrary to the rule, in this case both these deviating twin plants belonged to the same twin pair.

g) *Solanum*

Two twin pairs have also been observed in the potato cultures of Dr. R. LAMM, working at the cyto-genetic department of Svalöf. One of the twin pairs was obtained in a tetraploid south-American variety (*Solanum andigenum*), the other pair from a tetraploid segregation product of the cross triploid south American \times tetraploid European variety. Dr. LAMM has kindly informed me that both members of the first pair have 48 chromosomes whereas in the second pair one of the twins has 48 the other one 24 chromosomes. The latter individual consequently represents a haploid potato plant.

4. Morphology and fertility of the twin plants with deviating chromosome numbers

Under this heading only a few preliminary remarks will be made concerning vigour and fertility of the plants with deviating chromosome numbers. Some of these plants are now in flower, others have not yet started to bloom. Detailed accounts will follow in future papers in connection with studies of the progeny from such plants.

In wheat the *turgidum* twins with 42 chromosomes have normal vigour and are at present (August 1936) rather similar to the normal *turgidum*-plants. The quality of the pollen is poor, however, and seed setting very low, though the anthers dehisce. The same thing is true of one *vulgare*-plant, which has probably $2n = 63$.

The triploid *rye* individual ($2n = 21$) is quite similar to a normal rye plant but is possibly slightly more vigorous. Pollen fertility is surprisingly good, the percentage of apparently good pollen being almost as high as in normal rye. Though the anthers dehisce no seed was obtained from isolation of the first ear that flowered.

In *oats* most of the twin material obtained was received early in spring and had to be cultivated under artificial light in a greenhouse. On account of this treatment the plants were all infected by various diseases and in spite of transplantation into the open air they have not reached normal vigour. Therefore, morphological studies are at present out of the question. Fertility, however, is rather good in the 63-chromosome plants, and a fairly large number of seeds has already been obtained from self-fertilization.

The 63-chromosome plants of *Phleum pratense* seem to be slightly more vigorous than their corresponding twins, having the normal number 42. Different twin pairs, however, behave somewhat differently in this respect. Pollen fertility is surprisingly good in the 63-chromosome individuals, almost as good as in normal timothy. From a theoretical point of view the haploid timothy plant ($2n = 21$) is quite interesting, especially with respect to the probable origin of *Phleum pratense* from crosses between diploid and tetraploid *Phleum* species (GREGOR and SANSOME 1930). Morphologically the haploid, as expected, is rather slender and has thinner and narrower leaves than the sister twin with $2n = 42$. Also the culms are smaller and narrower in the haploid. Attempts to study meiosis in the haploid have hitherto been unsuccessful, since the anthers or at least the p.m.c. degenerated before meiosis. During the period of flowering, however, the plant was kept in a rather hot greenhouse, and a better result may perhaps be obtained under more favourable en-

vironmental conditions. The *haploid potato* plant is quite weak and has much narrower and thinner leaves than the corresponding tetraploid twin.

The two triploid twins of *Lolium perenne* are definitely more vigorous and have broader and thicker leaves than diploid plants from the same material. The same thing is true of the twins in *Poa pratensis*. At first sight the twins with an increased number of chromosomes may be distinguished from their low-numbered sister plants. The twins in *Lolium*, *Poa* and *Solanum* have not yet reached the flowering stage.

5. The origin of the twins with deviating chromosome numbers

From the report given above it is evident that twin plants have a tendency to get deviating chromosome numbers. Obviously this must in some way be connected with those cytological and embryological processes which lead to the formation of twin plants. These processes may only be elucidated in detail by direct embryological investigations, but owing to the very low frequency of twin seedlings it is practically hopeless to carry out such studies in the present material. In the cross-fertilizing species, such as rye and timothy, it may be possible, however, by continued selection of twin plants to increase the rate of twin formation and thus facilitate an embryological examination.—Pending such investigations a working hypothesis may nevertheless be suggested on the basis of the following facts:

a) The twin plants studied have generally the same chromosome number, but when the numbers are different one of the twins is generally triploid as compared to the other one.

b) Rather frequently the two twins are very different in vigour at an early stage, one of the twins being of normal size, the other having markedly reduced dimensions. This is evident from fig. 5 in the paper by NAMIKAWA and KAWAKAMI (1934), but is often much more pronounced. This difference in vigour strongly indicates that one of the twins has been formed in an embryologically abnormal way. This means a poor start for such a twin seedling, but at least if the twins are separated the weak dwarf seedling may ultimately develop into a quite vigorous plant. Now *the plants with deviating chromosome numbers in the majority of cases come from such weak seedlings.*

The twin material studied was labelled as a- and b-plants, the latter representing the weaker members of the twin seedlings. The difference between the a- and b-plants is not always distinct, and

sometimes both twins have just the same vigour. On an average, however, there is a manifest difference between the two categories. In the entire twin material hitherto examined 25 plants were found to have chromosome numbers deviating from the normal somatic number. Only five of these plants were a-plants, 19 individuals belonged to the b-category and one plant, from a triplet in *Poa pratensis*, was a c-plant (i.e. the weakest member of the triplet). Adding this plant to the b-group, it is evident that there is a significantly higher proportion of deviating b-plants than a-plants. The observed relation between a and b is $0,4 : 1,6 \pm 0,20$. These values, evidently, cannot represent a 1 : 1 distribution ($D/m_D = 3,0$).

Judging from the premises given above under a) and b) the most probable origin of the twin plants with deviating chromosome numbers seems to be the following. Though in the family *Gramineae* there is generally only one macrospore mother cell in the nucellus there may occur two (or even three) such cells in exceptional cases. From each of these cells an embryo sac will develop. (In barley the present writer has observed the exceptional presence of two embryo sacs instead of one). As a rule both of these embryo sacs will have the reduced chromosome number and both will be fertilized. Sometimes, however, only the "normal" embryo sac will be reduced, the other one developing without reduction from the other macrospore mother cell. It seems plausible to assume that this accessory macrospore mother cell may have a vegetative tendency, which sometimes leads to non-reduction. If this unreduced embryo sac is fertilized at the same time as the reduced one, the typical result will be obtained: one diploid and one triploid twin seedling.

For two reasons the triploid seedling will be weaker than the diploid one. Firstly, the normal, reduced embryo sac has probably a more favourable position in the nucellus and will be better nourished than the other one, and secondly, the relations between the chromosome numbers of embryo, endosperm and surrounding tissues in the unreduced embryo sac will be equal to $3n$, $5n$ and $2n$ respectively, instead of $2n$, $3n$ and $2n$ characteristic of the normal embryo sac. Much evidence is available which demonstrates that such deviations from the normal 2 : 3 : 2 ratio have a very pronounced effect on the viability of the embryos and hence probably also on the viability of the young seedlings (cf. MÜNTZING 1930, 1933, 1936).

The origin of haploids and tetraploids from twin seedlings remains to be considered. Though much rarer than the triploids, haploids have arisen not only in the twin material of NAMIKAWA and KAWAKAMI (1934) and in my own experiments but were also observed by KAPPERT (1933), working with *Linum*. According to

NAMIKAWA and KAWAKAMI (l.c.) a haploid plant of *Oryza sativa* has also been obtained from twin material (RAMIH, PARTHASARTHI and RAMANUJAM, 1933).—It may be assumed that the haploids arise from one member of twin embryo sacs, which are both reduced. Only one of them will be fertilized, which stimulates the other to parthenogenetic development. The origin of tetraploid twin seedlings (NAMIKAWA and KAWAKAMI l.c., 1 plant) is more difficult to imagine. Most probably this implies somatic doubling after fertilization, or possibly doubling at the beginning of the embryo development, if this has started parthenogenetically.

The exceptional production of one twin pair in *Lolium perenne*, in which *both* members were triploid, and a similar case in *Poa pratensis*, shows that the explanations given above do not cover all cases. In the case of *Lolium* it is more probable that both twins are derived from the same macrospore mother cell. Meiosis in this cell, however, has probably stopped at the formation of two unreduced daughter cells, from which two unreduced embryo sacs have developed. Both of these have been fertilized and this has resulted in the formation of two triploid twin embryos.

From his genetical and embryological results in *Linum*, KAPPERT (1933) is forced to conclude that in this genus the observed haploids are derived from the same embryo sac as the diploid twins, i.e. by parthenogenetic development of another cell than the egg cell. KAPPERT has also demonstrated that, as a rule, the diploid twins in *Linum* are genotypically indentical, having arisen by the splitting of one original embryo. As triploids were much more frequent than haploids in our twin material it seems necessary to assume that at least in the case of the triploids the twins develop from two different embryo sacs. The most frequent twin category, however, in which both members are diploid, may perhaps also in our material result from the splitting of one original embryo. This may be decided by future genetical and morphological studies, and is already strongly indicated by preliminary observations in *Phleum*, *Dactylis* and *Festuca*. On the other hand it seems rather probable that triploids may also occur among the *Linum* twins. Triploids are generally less conspicuous than haploids and may have been overlooked in KAPPERT's *Linum* material.

6. The theoretical and practical importance of the twin method

As problems of polyploidy in plants are at present of a rather central interest, it would be highly desirable to obtain a good method of artificial production of polyploids. No such method, however,

comparable e.g. to the X-ray method of inducing mutations, is at present available. Scattered positive results have been obtained by various methods. Of these the method of species hybridization, leading to allopolyploids, has on an average been the most effective one. The result of a species cross, however, depends much more on the nature of the material than on the intentions of the worker. With regard to autopolyploidy the regeneration method has given beautiful results in the mosses but is restricted to this plant group, just as the decapitation method can only be used in *Solanum* and a few other genera. The method of influencing the meiotic divisions by external agencies in order to obtain unreduced gametes and polyploid progeny is also rather difficult and does seldom lead to a regular production of polyploids.

The method introduced by RANDOLPH (1932) is the first really promising method, since in some cases it has lead to the production of a low but regular frequency of plants with doubled chromosome number. This result was obtained in maize by the application of high temperature at the time when the fertilized ovules begin to divide. Recently DORSEY (1936), using the same method, has also obtained positive results in rye and wheat. It may be added that after treatment with low temperature at the time of the first zygotic division, the present writer obtained a seedling of *Triticum turgidum* with doubled chromosome number ($2n = 56$). This seedling, however, did not survive the winter. Though promising this heat (or frost) treatment method is not always an easy way to get polyploids. At Svalöf strenuous efforts have been made to obtain tetraploid barley by this method but hitherto the result has been mainly negative.

Consequently, in contrast to all the other ways, the twin method is evidently a relatively comfortable means of obtaining heteroploid forms. And further, as plant twins are known to occur in a large number of genera, the application of this method may be expected to be of a rather general importance. According to KAPPERT (1933), SCHNARF has reported the occurrence of polyembryony in not less than 136 genera.

A characteristic feature of the twin method is the production of triploids or, in some cases, more correctly of forms having a 50 per cent higher chromosome number than usual. This is at the same time advantageous and disadvantageous. On account of their odd chromosome number such individuals are not immediately constant but will give rise to series of new types with different chromosome numbers. In later generations, however, stable products with changed chromosome numbers should be obtained. As regards the

final result different kinds of material will probably behave differently.

It is often difficult or impossible to obtain hybrids between polyploids and their original forms (cf. MÜNTZING 1936 pp. 300–304 and 326–334). The polyploid twins, however, represent such hybrids with odd chromosome numbers and may therefore in some cases be more valuable for the production of heteroploid forms than stable and incompatible strains. Therefore, the twin method will probably be extensively used for future studies concerning viability, fertility, morphology and physiology of heteroploid plants. It should also be pointed out that the twin method may be valuable not only for the production of autopolyploids but indirectly also for the formation of allopolyploids. If stable autopolyploids of different constitution are crossed, constant and fertile allopolyploids may immediately be formed, owing to autosyndesis (cf. MÜNTZING 1936, p. 338).

The twin method opens new possibilities also in two other respects, *viz.* for the study of haploids and for studies on the nature of apomixis. Though the general cytological and genetical features of haploids have already been elucidated, it may for several reasons be of interest to produce haploids of as many species as possible. Especially interesting is the type of chromosome pairing in such haploids as contain more than one genome. If, for instance, meiosis can be studied in the haploid timothy plant referred to above, it should proceed along the same lines as meiosis in the triploid hybrid between *Phleum alpinum* and *nodosum*, since, presumably, these species (*nodosum* = diploid *pratense*) are the ancestors of the hexaploid species *P. pratense* (GREGOR and SANSOME 1930).

As already pointed out by KAPPERT (1933) the facultative formation of twin embryos (or even larger numbers of embryos in the same seed) is of immediate interest in relation to the occurrence of habitual polyembryony in apomictic species.—In *Poa pratensis*, belonging to the present material, the occurrence of twin seedlings may directly be studied in relation to the nature of apomixis in this species. Pending more thorough studies, only a few features should be pointed out already now. The frequency of polyembryonic seeds is rather high in *Poa pratensis* and this is probably in some way correlated with the apomictic propagation, which is characteristic of the species. The occasional formation of “triploid” twin plants, however, resulting from fertilization of unreduced ovules, demonstrates that apomixis in *Poa pratensis* is not absolute. This is in accordance with the results of ÅKERBERG (1936), who succeeded in obtaining a few hybrids in *Poa pratensis* in addition to a majority of maternal offspring. These hybrids, however, just as the “triploid”

twin seedlings, seem to result from the union of unreduced female and reduced male gametes (ÅKERBERG 1936, p. 238). Unreduced ovules have also been observed to function rather frequently in sexual strains of *Poa alpina* but, on the other hand, I have obtained "haploids" in *Poa alpina* in the offspring from hybrids between sexual and apomictic plants (unpublished results). Finally it should be mentioned that a "haploid" of *Poa pratensis* with $2n = 36$ has been obtained from an apomictic biotype with $2n = 72$. The "haploid" type proved to be sexual and markedly sterile (MÜNTZING, unpublished results). The high frequency of twin seedlings in *Poa pratensis* and the observed occurrence of twins with deviating chromosome number in this species makes it likely that this sexual haploid has arisen as a twin seedling.—

The production of twin plants with deviating chromosome numbers is in itself very interesting. The main value of the phenomenon, however, is the fact that it represents a new method which may be used for the production of a rich material of heteroploid forms. In the first place this material gives rise to many new theoretical problems but may also be of practical importance. In several cases mentioned above the new products have gigas characters (*Phleum*, *Lolium*, *Poa*) and may possibly give rise to high-yielding varieties, either directly as in *Poa* (thanks to apomictic propagation) or indirectly after stabilization.

Summary

1) The chromosome numbers of twin seedlings in various species of cultivated plants have been examined. Though most of the twins have the normal chromosome number, twin seedlings with deviating chromosome numbers were found in the following species: *Triticum vulgare*, *Triticum turgidum*, *Secale cereale*, *Avena sativa*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Lolium perenne* and *Solanum tuberosum*.

2) If the twin plants differ in chromosome number, one of the twins is generally triploid in relation to the other one. This may be due to simultaneous fertilization of reduced and unreduced embryo sacs.

3) Attention is called to the theoretical and practical importance of the twin method. Though the twins are formed in a low frequency, a rich material may be obtained by cooperation with seed control stations.

Literature cited

- 1) Dorsey, E. 1936. Induced polyploidy in wheat and rye.—Journ. of Heredity, Vol. 27, No. 4, pp. 155-160.
 - 2) Gregor, J. W. and Sansome, F. W. 1930. Experiments on the genetics of wild populations. II. *Phleum pratense* L. and the hybrid *P. pratense* L. × *P. alpinum* L.—Journ. of Genetics, Vol. 22, No. 3, pp. 373-387.
 - 3) Kappert, H. 1933. Erbliche Polyembryonie bei *Linum usitatissimum*.—Biolog. Zentralbl. Bd. 53, H. 5/6, pp. 276-307.
 - 4) Müntzing, A. 1930. Über Chromosomenvermehrung in *Galeopsis*-Kreuzungen und ihre phylogenetische Bedeutung.—Hereditas 14, pp. 153-172.
 - 5) — 1932. Apomictic and sexual seed formation in *Poa*.—Hereditas 17, pp. 131-154.
 - 6) — 1933. Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy.—Hereditas 18, pp. 33-55.
 - 7) — 1936. The evolutionary significance of autopolyploidy.—Hereditas 21, pp. 263-378.
 - 8) Namikawa, S. and Kawakami, J. 1934. On the occurrence of the haploid, triploid and tetraploid plants in twin seedlings of common wheat.—Proc. of Imp. Acad. (Tokyo), Vol. 10, No. 10, pp. 668-671.
 - 9) Ramih, K., Parthasarathi, N. and Ramanujam, S. 1933. Haploid plant in rice (*Oryza sativa*).—Current Sci. Mysore, Bd. 1, pp. 277-278.
 - 10) Rancken, G. 1934. Zytologische Untersuchungen an einigen wirtschaftlich wertvollen Wiesengräsern.—Acta Agr. Fennica 29.
 - 11) Randolph, L. F. 1932. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize.—Proc. of the National Academy of Sciences, Vol. 18, No. 3, pp. 222-223.
 - 12) Åkerberg, E. 1936. Studien über die Samenbildung bei *Poa pratensis* L.—Botan. Notiser, pp. 213-280.
-

Abnormal Inheritance in Relation to the "bobbied" Character of *Drosophila ananassae*

By

Daigoro Moriwaki

Biological Institute, Furitsu Koto Gakko, Tokyo

The bobbied character of *Drosophila ananassae* is known to be manifested by gene bobbied in the X-chromosome, as already reported (Moriwaki, 1935). It has been also described that only the females showed the character—minute bristles—similarly as in *D. melanogaster*, seeing that the Y-chromosome of males carried its normal allele. But the expression of the gene bobbied in the females manifested itself in various ways, even to nearly normal. In the course of my experiments, however, using bobbied flies, I obtained a case in which the bobbied character was expressed in the male, accompanied probably with some abnormalities.

Male pupae with purplish (*ph*...eye colour, I-48.4) and bobbied (*bb*, I-109.3) genes were irradiated for 20 minutes with x-rays of 50 K.V., 40 m.a., 20 cm, after which the males were mated with untreated females carrying the same characters. Out of 2130 male offspring, 7 flies, particularly, manifested purplish and bobbied characters, while in the females 4 flies appeared with only purplish. Of these eleven exceptions, only 1 female and 2 males were fertile, one of which latter forms the subject of this study.

I desire to acknowledge here my indebtedness to Prof. Y. Imai for his kind guidance during these experiments. The expenses in connection with the present investigation were defrayed with the grant given by the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan.

Mutation of Minute Gene

The solitary male fly in question, which had the appearance of *ph bb*, was crossed with 3 females of *ph bb* from an untreated stock. Only one female with *ph bb* was raised, while the male progeny segregated into 12 *ph* "B"* and 9 *ph*, which led us to presume mutation of an autosomal dominant gene, Minute, to verify which the F₁ males with *ph* "B" were crossed with wild females with the following results:

* Hereinafter flies having the appearance of a *bb* character will be denoted by "B".

	Females	Males
+	216	230
"B"	122	158.

From this we could regard the gene expressing "B" in these flies as Minute. Investigations showed that this Minute gene belongs to the second chromosome, and that it has a lethal effect when homozygous, and partially so when heterozygous. It was also found that flies carrying the gene generally emerge a few days later than other flies of the same culture. The locus of the gene, which was named Minute-IIb (*M-IIb*), has not yet been determined for the reason that the recombination values with cardinal (II-0.0) and Plexate (II-25.9) were each nearly 50 per cent.

In order to eliminate both *ph* and *bb* from the X-chromosomes in the stock of Minute-IIb, the "B" males of the F₂ generation were first of all mated with wild females, so that the stock was perpetuated by selecting only *M-IIb* flies for every generation.

Unexpected Appearance of Bobbed-like Flies

Hitherto it was nothing more than a mutation of Minute gene. In this pedigree, however, unexpected bobbed-like flies, that is "B", frequently appeared. Examples of these cases will now be given.

(1) Although the F₂ + males just mentioned were not expected to carry any *bb* genes, the progeny raised from the cross with *ph bb* females segregated into

		Females	Males
Expected	+	218	/
	<i>ph</i>	/	314
Unexpected	"B"	91	0.

The minute bristles of the unexpected "B" flies were more conspicuous than those of *bb* flies. The fact that these flies, however, were all females leads us to suppose that we are dealing with *bb* genes.

(2) Concerning the test crossings for determining the linkage group of Minute-IIb, another case of unexpected appearance occurred. In the first place, crosses of Minute-IIb with cardinal (*cd*, II) or plexus (*px*, III) showed such a peculiarity that when the mother was *M-IIb*, the progeny were always only normal flies, while the *M-IIb* father produced both *M-IIb* and +. Secondly, the normal flies in the progeny were inbred, in the offspring of which appeared the unexpected "B". The results of the first and second crosses are shown in Table 1.

Table 1

Character	$\text{♀} (M-IIb) \times \text{♂} (cd)$	$\text{♀} (cd) \times \text{♂} (M-IIb)$	$\text{♀} (M-IIb) \times \text{♂} (px)$	$\text{♀} (px) \times \text{♂} (M-IIb)$
Females $\left\{ \begin{array}{l} M-IIb \\ + \end{array} \right.$	$\begin{array}{c} 0 \\ 34 \end{array}$	$\begin{array}{c} 24 \\ 36 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0 \\ 32 \end{array}$	$\begin{array}{c} 11 \\ 22 \end{array}$
Males $\left\{ \begin{array}{l} M-IIb \\ + \end{array} \right.$	$\begin{array}{c} 0 \\ 23 \end{array}$	$\begin{array}{c} 27 \\ 34 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0 \\ 35 \end{array}$	$\begin{array}{c} 23 \\ 16 \end{array}$
	↓	↓	↓	↓
Character	$\text{♀} (+) \times \text{♂} (+)$	$\text{♀} (+) \times \text{♂} (+)$	$\text{♀} (+) \times \text{♂} (+)$	$\text{♀} (+) \times \text{♂} (+)$
Females $\left\{ \begin{array}{l} + \\ cd (px) \\ "B", \\ "B" cd (px) \end{array} \right.$	$\begin{array}{c} 46 \\ 11 \\ 17 \\ 2 \end{array}$	$\begin{array}{c} 40 \\ 14 \\ 6 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{c} 69 \\ 13 \\ 26 \\ 4 \end{array}$	$\begin{array}{c} 59 \\ 11 \\ 2 \\ 0 \end{array}$
Males $\left\{ \begin{array}{l} + \\ cd (px) \end{array} \right.$	$\begin{array}{c} 63 \\ 24 \end{array}$	$\begin{array}{c} 52 \\ 13 \end{array}$	$\begin{array}{c} 44 \\ 13 \end{array}$	$\begin{array}{c} 64 \\ 23 \end{array}$

It will be seen from the foregoing data that the unexpected "B" appeared only in females. We may add that the *M-IIb* stock used had been selected for some ten generations.

(3) Following the preceding experiments, *M-IIb* females of the same stock were crossed with wild males, resulting in 315 normal females and 336 normal males with 1 "B" male which was sterile. Inbreeding of these normal flies gave the following results:

	Females	Males
+	193	230
"B"	31	0.

According to a test crossing, the female "B" seems to be *bb* itself. This however needs to be confirmed.

Reexamination of the Minute-IIb Stock

With a view to analyse the factors responsible for the appearance of *bb*-like flies, I examined once more the Minute-IIb stock, which, however, was renewed by mating *M-IIb* males with normal females. The reexamination involved five tests, namely,

- Test-1 $\text{♀} (M-IIb) 1 \times \text{♂} (+) 3$ out breeding ;
13 fertile cultures
- Test-2 $M-IIb \text{ stock} \rightarrow \text{♂} (+) 1 \times \text{♀} (+) 2$ out breeding ;
14 fertile cultures
- Test-3 $M-IIb \text{ stock} \rightarrow \text{♀} (+) 1 \times \text{♂} (+) 3$ out breeding ;
10 fertile cultures
- Test-4 $\text{♂} (M-IIb) 1 \times \text{♀} (+) 1-3$ out breeding ;
6 fertile cultures

Test-5a (Test-4/a) Test-4 \rightarrow ♀ (+) \times ♂ (+) mass ; inbreeding ;
 8 fertile cultures
 ,, b (, , /b) Test-4 \rightarrow ♂ (+) \times ♀ (bb) ... mass ; out breeding ;
 4 fertile cultures.

1. Test-1

In contrast to the previous case, in which the same cross produced only normal progeny, 8 pairs out of 13 fertile cultures resulted in *M-IIb* flies, as shown below:

	Females	Males
+	140	145
<i>M-IIb</i>	117	99.

At the same time only normal flies arose from the 4 other cultures, the remaining one yielding 1 male "B" in addition to normal offspring. Further test showed that inbreeding of these normal flies could segregate "B" females.

2. Test-2

The results of 14 fertile cultures of this test are summarized in Table 2.

The case Test-2-16 differed from the previous examples in the matter of the appearance of "B" males, all of which, however, seemed to be sterile.

Table 2

Character	Sum of 12 cultures	Test-2-14	Test-2-16
Females { + "B"	696 0	36 5	64 3
Males { + "B"	620 0	36 0	69 9

It is also remarkable that in the next generation that resulted from mating the female "B" of Test-2-16 with wild males, both females and males of "B" appeared again, notwithstanding that the same crossing of Test-2-14 gave only normal flies.

3. Test-3

In 8 fertile cultures out of 10, only normal flies resulted, whereas in 2 cases, namely, Test-3-7 and Test-3-9, 1 female "B" appeared in addition in each case. One "B" of Test-3-7 was lost before testing, but the other "B" female from Test-3-9 was crossed with wild males with the following result:

	Females	Males
+	14	14
"B"	9	8.

4. Test-4

Table 3 gives the results of the test.

Table 3

Character	Sum of 5 cultures, except Test-4-1	Test-4-1
Females { +	177	54
{ <i>M-IIb</i>	129	3*
Males { +	174	50
{ <i>M-IIb</i>	149	0

*. These 3 flies may not be *M-IIb*, but "B".

Table 4

Character	(a) Test-4-1/a-1		(b) Test-4-1/b-1	
	Females	Males	Females	Males
+	128	176	57	83
"B"	18	0	18	0

Considerations

The causes of the abnormal inheritance in relation to the bobbed character may be various, such for example as those due to chromosome fragments, mutation of another bobbed gene, modified expression of Minute-IIb gene, etc. But I think it can be best explained by assuming fragmentation of the *bb*-region in the X-chromosome, although a satisfactory cytological proof of it has not yet been obtained.

Mutation of another bobbed gene would not conclusively explain the three examples of the unexpected appearance of "B". Granting that it is mutated, it cannot be included in the X-chromosome, seeing that it has been replaced with a normal one at the start. But the correlation between "B" and the female sex suggests some relationship with X-chromosome. As bearing on this question, an interesting study was made by Kikkawa (1936), who showed that the IV-chromosome of *D. ananassae* may be partly homologous with the Y-chromosome. He recently informed me that he had obtained a mutation of *bb*-like character, the gene of which seemed to be in the fourth chromosome where no gene had ever yet been recognized. As to whether all this explains my present case is a matter on which nothing definite can be said at present.

As for the second and third examples, in which the stock of *M-IIb* looks as if it might have taken the *bb* gene into the X-chromosomes again, the fragment idea seems appropriate. That is, I conceived that during the almost ten generations of selection there might have occurred crossing over between the normal X-chromosome and the *bb*-fragment.

In the next place, in the five tests for reexamining the *M-IIb* stock, a singular thing is that in the two cultures, Test-2-16 and Test-

As will be seen from the table, Test-4-1 seems to differ from the other cultures. This is confirmed by the next test.

5. Test-5 (Text-4/a and Text-4/b)

As suspected, each pedigree of Test-4-1 showed a different result (Table 4) from the others, in which latter all the progeny were normal.

3-9, "B" males appeared. Whether the cause or causes that brought about these two conditions differ from that of the others, is not yet known, but by the assumption of fragmentation we can regard the cause, generally speaking, as the same. The various forms due to combinations of $+^{bb}$ gene of Y- or X-chromosome, bb in X-chromosome, and bb -fragments, may manifest each phenotype, none of which however has yet been identified. It also seems that the bb gene in the fragment seems to have a little stronger expression than bb itself.

Summary

1. In an x-rayed series with purplish (ph) and bobbed (bb) characters of *Drosophila ananassae*, an autosomal dominant gene capable of causing the bristles to be minute was found. The gene, Minute-IIb, belongs to the second chromosome, the locus of which however has not yet been determined, the recombination values with cardinal (II-0.0) and Plexate (II-25.9) each being nearly 50 per cent.

2. During the experiments in which the pedigree of Minute-IIb was used, another bb -like character unexpectedly appeared at times: the parents in this case, it being always believed, carry neither $M-IIb$ nor bb genotypically.

3. As an explanation of the unexpected appearance of bb -like character, I proposed that we assume fragmentation of the bb -region in the X-chromosome, which would go far towards explaining the peculiar examples here mentioned, although no satisfactory cytological proof of it has yet been obtained.

Literature Cited

- Kikkawa, H. 1936. Chromosomes of *Drosophila ananassae* (A Preliminary Note). Jap. Jour. Genetics, 12: 65-66. In Japanese.
Moriwaki, D. 1935. Bobbed Mutation in *Drosophila ananassae*. Proc. Imp. Acad. (Tokyo), 11: 340-341.
-

Über das Stigma bei farblosen Flagellaten

Von

Ernst G. Pringsheim, Prag

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Universität

I. Morphologisches

Die meisten gefärbten Flagellaten und Flagellatenstadien von Algen besitzen einen Augenfleck, auch Stigma genannt. Das ist ein Gebilde welches durch Carotine rot gefärbte Öltröpfchen enthält, nach deren Entfernung durch organische Lösungsmittel es als eine dichtere Stelle im Protoplasma sichtbar bleibt. Meist stellt es eine tellerartig gewölbte, rundliche Scheibe dar, kann aber auch länglich, selbst strichförmig sein. Fast immer liegt es am Vorderende, nicht weit vom Geißelansatz, bei Chlamydomonaden aber zuweilen auch weiter hinten, selbst hinter der Mitte der Zelle. Bei allen Volvocineen ist es ein oberflächliches Gebilde und kann sogar über den sonstigen Umfang hinaus ragen, während es bei den Eugleninen der Hauptvakuole anliegt. Die stark rote Farbe macht das Stigma vielfach sehr auffällig; doch gibt es auch winzig kleine oder blaß gefärbte, selbst farblose Augenflecke. Oft sind sie schwer zu erkennen und nur bei gutem Licht, offener Blende und bester Optik sicher nachzuweisen.

Die Art der Ausbildung des Stigmas scheint phänotypisch nicht beeinflusbar zu sein, d.h. eine taxonomische Einheit hat immer das gleiche Stigma. Bei den von den Algologen beschriebenen Arten kann es in seiner Ausbildung schwanken; leitet man aber von einer Zelle Klonkulturen ab, so haben alle Zellen das gleiche Stigma.

Bei der Teilung der Zellen müssen neue Stigmata entstehen. Wir wissen nicht viel mehr als daß das zwischen der Kern- und der Zellteilung zu geschehen pflegt. Der Vorgang selbst ist in den meisten Fällen unbekannt, ebenso wie das Schicksal anderer Zellorgane, etwa der pulsierenden Vakuolen, während der Teilung der Zellen. Bei den Eugleninen wird das Stigma gespalten (KLEBS 1883, DANGEARD 1901). Dieses Verhalten ist aber nach OLTMANN (1923, S. 93) die Ausnahme, und die Neubildung häufiger: „Bei den Chlamydomonaden wird derselbe für die jungen Schwärmer nicht verwertet, höchstens wird einem derselben der alte Augenfleck überwiesen.“ Das letztere scheint mir allerdings wenig wahrscheinlich. Bei stigmatisierten *Polytomen*, bei denen sich die Verhältnisse besser übersehen lassen als bei *Chlamydomonas*, weil die anderen Farbstoffe fehlen, geht das alte Stigma verloren, ebenso wie Zellhaut

und Geißeln, und die Tochterzellen bilden neue aus. Dies läßt sich sicherstellen, weil sie anfangs kein Stigma besitzen. Ähnlich verhält sich *Chlorogonium* (GEITLER 1934, 44). Es ist damit aber nicht entschieden, ob nicht vorher ein ungefärbtes, sich durch Teilung vermehrendes Gebilde vorhanden ist, das vom alten Stigma abstammen kann.

Nur bei schwacher Vergrößerung erscheint das Stigma einheitlich rot, bei stärkerer ist es stets gekörnt, und man erkennt verschieden große rote Punkte, welche aus einer ölartigem, stark lichtbrechenden Masse bestehen. Mit Alkohol läßt sich daraus der Farbstoff ausziehen. Untersucht ist er bisher nur bei *Astasia (ocellata) quartana* PRINGSHEIM (PRINGSHEIM und MAINX 1926, S. 591). Hier besteht er aus Carotin, während Xanthophyll nicht vorhanden ist, das es sonst so oft begleitet. Bei gefärbten Flagellaten und Zoosporen ist eine solche Entscheidung kaum möglich, weil sie die gelben Begleitfarbstoffe des Chlorophylles in ihren Chromatophoren führen.

Über die morphologische Wertigkeit des Stigmas gibt es eine ganze Anzahl von Äußerungen; nur haben die Verff. oft nichts von einander gewußt. Der erste Beitrag zu der Frage ist wohl der von GUIGNARD (1889), der die Entwicklung der männlichen Gameten von *Fucus* untersucht und ein farbloses Gebilde gefunden hat, das später rot wurde. Er deutet das so, daß hier das Stigma aus einem Leukoplasten entstehe. Diese Auffassung ist als Tatsache in die Literatur eingegangen (z.B. HARDER 1936, S. 333). Sie stammt nicht erst von MANGENOT (1922), [der die Beobachtungen bei *Fucus* noch einmal erhoben hat,] wie CHADEFAUD (1932) meint. In der Monographie von FRANZE über das Stigma der Mastigophoren finden wir zu unserer Frage die folgende Bemerkung: „Die Verteilung der Stigmata ist bei den Flagellaten so ziemlich auf die mit Chromatophoren versehenen Formen beschränkt“ (1893, S. 38f), und er meint weiter: „Die Pigmentosa (so nennt F. das Stigma)—scheint ein Analogon der Chromoplasten in den Zellen höherer Pflanzen zu sein“ (S. 53). P. A. DANGEARD (1901, S. 28) hat einen ähnlichen Gedanken ausgesprochen, sich aber vorsichtigerweise auf seine Untersuchungsobjekte beschränkt: „Le point oculiforme des *Euglènes* se comporte comme un leucite; il se divise au moment de la bipartition de la cellule, ainsi que KLEBS l'a constaté.“ Die Beobachtungstatsache stammt also, wie so vieles auf diesem Gebiete, von KLEBS. Die Deutung wird nur so nebenher gegeben, ohne daß gesagt ist, worin eigentlich diese besondere Ähnlichkeit im Verhalten bestehen soll, oder warum an Leukoplasten und nicht an Chromoplasten gedacht wird.

Während die genannten Autoren nur eine morphologische Beziehung oder Ähnlichkeit zwischen Plastiden und Stigmen angegeben haben, hat dann ROTHERT (1914) seine bekannte Theorie aufgestellt, „daß die roten Stigmata oder Augenflecke, welche den Schwärmzuständen der Algen und grünen Flagellaten fast allgemein zuzukommen scheinen, nichts anderes als ein Spezialfall von Chromoplasten sind.“ Wenn man ihn gefragt hätte, dürfte er auch die „nichtgrünen“, d.h. anders oder garnicht gefärbten Flagellaten eingerechnet haben, da er ja auch *Fucus* als Beispiel nennt. Obgleich ROTHERT für seinen geistreichen Gedanken, den er wohl einer genaueren Prüfung wert erachtete, nicht viel anzuführen hat, ist seine Auffassung vielfach angenommen worden. PASCHER (1929, S. 396) z.B. hält „die Plastidennatur des Stigmas nach den Untersuchungen ROTHERTS, MASTS usw. für gesichert“. Soweit ich die Arbeiten von MAST kenne, finden sich in ihnen sehr ins einzelne gehende. z.T. reichlich phantasievolle Angaben über das Stigma von Volvocaceen, aber nichts, woraus dessen Plastidennatur sicher hervorginge oder was eine solche allgemeine Aussage ermöglichte. Und ROTHERT selbst hat keine Untersuchungen zu dieser Frage angestellt. Mit Recht sagt PASCHER noch 1927 (S. 34) vorsichtiger: „In der morphologischen Deutung des Stigmas besteht keine Übereinstimmung; aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich um einen modifizierten Chromoplasten.“ Andere Deutungen, die er dort anführt und ablehnt, bedürfen keiner Erwähnung mehr.

In der geschichtlichen Reihenfolge ist MANGENOT (1922) zu nennen, der das Stigma der *Fucus*-Spermatozoen seiner Entstehung wegen als zum Plastidenapparat gehörig auffaßt. Vor allem ist es aber CHADEFAUD, der neuerdings auf Grund sehr bemerkenswerter Beobachtungen eine andersartige Beziehung zwischen Plastiden und Stigmen aufdeckt. ROTHERTS Arbeit ist ihm nicht bekannt.

CHADEFAUD (1932) fand bei einer Chrysomonade, der er keinen Namen gibt—nennen wir sie *Ochromonas Chadefaudii*, da es sich nach Beschreibung und Abbildung um eine neue Art dieser Gattung handelt¹⁾—daß das Stigma einem, in der Einzahl vorhandenen, kleinen, blaßbraun gefärbten Chromatophor als eine rote Kappe aufliegt. Das Bemerkenswerte ist nun, daß vor der Zellteilung das Chromatophor sich durch Teilung verdoppelt und daß darauf an dem zweiten ein neues Stigma sich bildet, welches erst später in der jungen

Anm. 1) Die Art soll zwischen *Monas* und *Chlorochromonas* stehen (S. 184) d. h. wohl einen wenig funktionstüchtigen Assimilationsapparat besitzen. Es ist aber bedenklich aus der Färbung des Chromatophors auf seine Arbeitsfähigkeit zu schließen. Unter dem Mikroskop sehen die Chrysomonaden meist sehr hell aus, auch diejenigen, welche sicher autotroph sind.

Zelle die richtige Lage am Vorderende gewinnt.¹⁾ Ähnliche Beziehungen sollen auch in anderen Fällen vorliegen, z.B. bei den Zoosporen von *Tribonema* (S. 182). In diesem Zusammenhang können die apochlorotischen, stigmatisierten Arten von besonderer Bedeutung sein. CHADEFAUD meint, daß in solchen Fällen, z.B. bei *Antophrysa Steinii* die Plastiden mitochondrial seien und deshalb übersehen worden sind, während sie bei den *Fucus*-Spermatozoen nachgewiesen werden konnten. Diese Anschauung ist einleuchtend, wenn man an die besondere Natur der „Mitochondrien“ glaubt, in denen ich nur die physikalisch bedingte Erscheinungsform verschiedener plasmatischer Teilchen sehen kann (PRINGSHEIM 19). Jedenfalls ist ein sicheres Kennzeichen von Mitochondrien nicht bekannt.

Bemerkenswert und für die morphologische Wertigkeit des Stigmas wie für die Beurteilung älterer Arbeiten wichtig ist die Tatsache daß zuweilen an der Stelle, wo ein Stigma zu erwarten wäre, ein ungefärbtes Gebilde auftritt, das aus dichter Masse besteht als das übrige Plasma. (PASCHER 1927, S. 34, VISCHER 1932, S. 268). PASCHER sagt dort: „Zahlreiche Volvocalen haben kein Stigma, sei es, daß sie es normalerweise nicht oder nur ausnahmsweise anfärben, sei es, daß sie es überhaupt nicht haben. Für ersteren Umstand spricht die wiederholt von mir beobachtete Tatsache, daß bei scheinbar nicht stigmatisierten Formen immer eine bestimmte Stelle im Dunkelfeld aufleuchtet“. W. VISCHER äußert sich über die Schwärmer von *Mischococcus sphaerocephalus* folgendermaßen (1932, S. 268): „Die Zoosporen sind oval, 7–8 μ lang, besitzen zwei durchsichtige Chromatophoren und zwei ungleiche Geißeln, die etwas seitlich inseriert sind—. Ein rotes Stigma ist nicht deutlich wahrzunehmen; etwa einmal schien ein solches vorhanden zu sein; bei genauerem Zusehen konnte jedoch nur ein stärker lichtbrechendes, winziges Körperchen festgestellt werden, das ungefärbt war. In diesem Punkte schließe ich mich BORZI (1895, S. 121, Studi algologici Fasc. II, Palermo) an, der von einem farblosen Stigma spricht (stigma achroum).“²⁾

Anm. 1). Das Referat über die Arbeit von CHADEFAUD im Botanischen Zentralblatt von MOEWUS (1933, 22, 238) gibt den Inhalt falsch wieder. Dem Satz „Während man bei farblosen Heterokonten immer noch das Plastidom nachweisen kann, ist das bei *Polytoma* nicht mehr der Fall“ steht in der Arbeit der folgende gegenüber: „Chez *Polytoma*, d'après le travail récent de VOLKONSKY, on retrouve ce chromatophore, tapissant toute la paroi cellulaire...“ Auch sonst ist das Referat unbrauchbar.

Anm. 2). Es gibt noch weitere Literature über farblose Stigmata, die ich z. T. nicht kenne, aber hier anführen möchte. 1883 PELLETAN nach FRANZE: farbloser Augenfleck bei *Dinobryon*. 1893 FRANZE S. 155: „Wir können uns diese Verhältnisse so erklären, daß hier die Bildung des Farbstoffes in der Pigmentosa unterblieb.“ 1895 BORZI: Stigma achroum (siehe oben). 1927 PASCHER:

Nach CHADEF AUD (1933, S. 184), der VISCHER nicht nennt, gibt es bei derselben Heterokonten-Gattung *Mischococcus* neben Arten mit ungefärbtem Stigma auch den Fall, daß anfangs ungefärbte Gebilde sich später rot färben, so bei *Misch. confervicola*. Die beiden, unabhängig von einander entstandenen Arbeiten sichern die Tatsache, daß das Stigma nicht einfach ein roter Fleck im Protoplasma ist, sondern eine morphologische Grundlage besitzt. Umgekehrt gibt es auch den Fall, daß das Stigma während der Entwicklung von Zoosporen vorübergehend rot erscheint, aber vor der Entleerung seinen Farbstoff wieder verliert. Das hat PASCHER (1929, S. 396) bei den Zoosporen von *Characium Chrysopyxidis*, einer farblosen Protococcale, beobachtet. Hier ist das Stigma also sicher funktionslos, was PASCHER zu der Meinung gebracht hat, daß es bei den heterotrophen Arten keine Bedeutung mehr hat und allmählich rückgebildet wird. Wie dem auch sei, die Tatsache, daß es auch bei gefärbten Arten farblose Stigmen gibt und umgekehrt, zeigt, daß eine Beziehung zwischen der Farbe der Plastiden und der des Stigmas nicht zu bestehen braucht.

Ohne allerdings eigene Untersuchungen angestellt zu haben, nur aus den Angaben der Literatur, kann ich keinen Beweis dafür finden, daß das Stigma überall, oder auch nur bei einer bestimmten Verwandtschaftsgruppe zum Plastiden-Apparat gehöre. Die Leukoplasten oder Mitochondrien, aus denen es hier und da entstehen soll, können ebenso gut als ein plasmatisches Gebilde eigener Art, eben als ungefärbter Augenfleck, als Stigma achroum, aufgefaßt werden. Auch OLTMANNS (1923, S. 93) lehnt ROTHERTS Theorie ab. (Siehe oben). Bei den Volvocineen werde das Stigma der Mutterzelle für die jungen Schwärmer nicht verwendet sondern gehe zu Grunde. Hierfür führt schon ROTHERT (1914, S. 95) einige Beispiele aus der Literatur an. Natürlich kann sich ein ungefärbtes Gebilde geteilt haben. Im Ganzen halte ich es nicht einmal für wahrscheinlich, daß das Stigma in den verschiedenen Flagellaten- und Algenreihen als morphologisch gleichartig zu verstehen ist. Das gibt auch ROTHERT zu.

Etwas anderes ist eine Beziehung zwischen Stigma und Plastiden in Bezug auf Lage und Entstehung.¹⁾ Eine solche besteht zweifellos

Aufleuchten im Dunkelfeld. VISCHER 1932 (siehe oben). CHADEF AUD 1933 S. 183: bei den *Monas*-Arten, welche scheinbar kein Stigma haben, kann es vorhanden aber farblos sein. So denken nach ihm auch GRASSÉ, ALEXEIEFF und BEAUCHAMP. GRASSÉ, dessen Ausführungen etwas unklar sind, nimmt ein farbloses Stigma auch für Astasiaceen an (1926, S. 1013); es ist aber nicht gesagt, was für Beobachtungen ihn zu dieser Auffassung gebracht haben.

Anm. 1) OLTMANNS (1923, S. 93) meint: „Nun wäre es nicht ausgeschlossen, daß von den Chromatophoren ein Stück abgegliedert würde, um den Augenfleck zu bilden, aber genau gesehen wurde das bislang nicht.“

oft, aber doch nicht allgemein, sondern nur bei Chrysomonaden und allenfalls Chlamydomonaden. Gerade in diesen Fällen kann das Stigma aber kein Chromatophor sein, sondern höchstens von einem solchen gebildet werden, wie die Stärke am Pyrenoid. Bei den Eugleninen fehlt auch diese Lagebeziehung, und da bei ihnen die Paramylon-Körner gleichfalls nicht an den Chloroplasten entstehen, so verfängt das von ROTHERT S. 94 angeführte Argument nicht, daß die von FRANZE am Augenfleck beobachteten Körnchen für die Plastidennatur der Stigmen sprächen, denn diese wären „imstande das jeweilig nämliche Produkt zu bilden wie die Chloroplasten desselben Organismus.“ Die Tatsache, daß bei höheren Pflanzen niemals zweierlei Plastiden in der gleichen Zelle vorzukommen scheinen, will ich hier nicht weiter verwerten, weil das bei niederen Lebewesen anders sein kann. Dagegen spricht die Erhaltung der Augenflecke beim Verlust der Plastiden, die wir nicht selten finden, eher gegen ihre morphologische Gleichwertigkeit, denn es wäre doch wenig wahrscheinlich, daß ein Chromatophor erhalten bliebe, während die anderen alle verschwänden, zumal wenn wir uns PASCHERS (1929, S. 396) Meinung zu eigen machen, „daß das Stigma nur bei Formen mit CO_2 -Assimilation von Bedeutung ist, daß es aber bei den heterotrophen Formen, bei denen eine derart enge Gebundenheit an das Licht wie bei den chlorophyll-autotrophen Formen nicht vorhanden ist, bedeutungslos wird und verloren geht.“

II. Systematisches

Wie bekannt, ist das Stigma bei den chlorophyllführenden Flagellatenstadien ungemein verbreitet; doch fehlt es auch bei einigen. Umgekehrt ist es bei den farblosen Flagellaten selten, kommt aber doch zuweilen in schönster Ausbildung vor. Unwillkürlich fragt man sich da, ob irgend welche Beziehungen zwischen systematischer Stellung und Stigmen-Besitz bestehen. Das ist nun zweifellos der Fall. Eine Betrachtung hierüber findet sich bei PASCHER (1929, S. 395).

Wir finden unter den farblosen Flagellaten Augenflecke nur bei solchen Arten, welche chlorophyllhaltigen nahe stehen, d.h. bei denen infolge morphologischer Ähnlichkeit die Verwandtschaft erkennbar ist. Diese Ähnlichkeit kann nach PASCHER in der Ausbildungsart der Zellen, der Cysten, der geformten Reservestoffe oder der Fortpflanzung deutlich hervortreten, obgleich der Verlust der Assimilationsfarbstoffe eine heterotrophe Ernährung notwendig macht.

Da wir im Anschluß an FERD. COHN (1854), KLEBS (1883) und PASCHER (1916) heut als sicher annehmen, daß die farblosen Arten

durch Verlust des Chlorophylls und seiner Begleitfarbstoffe, also durch „Apochlorose“ aus gefärbten entstanden sind, und nicht umgekehrt, so können wir auch das Stigma bei den heterotrophen Flagellaten als Überrest von den gefärbten Vorfahren her ansehen. Damit soll nicht gesagt sein, daß es rückgebildet oder funktionslos sein muß. Ganz deutlich ist der Besitz eines Augenfleckes um so häufiger, je näher eine Art stigmenführenden grünen Verwandten steht. Doch ist er immerhin auch bei den noch mit den typischen Reservekohlehydraten versehenen Phytomonaden und Eugleninen, soweit sie farblos sind, seltener als bei den grünen.

Das Stigma verhält sich also ähnlich wie die Stärke und das Paramylon. Bei Verlust der Assimilationstätigkeit, mit der man Augenfleck und Reservestoff-Kohlehydrate biologisch in Zusammenhang zu bringen pflegt, kann dennoch das eine oder andere, oder auch beides erhalten bleiben.

Wir wollen die den grünen Arten noch nahe stehenden Einzeller der Einfachheit wegen mit einem von LWOFF (1932) geprägten Ausdruck „Leukophyten“ nennen,—ohne uns daran zu kehren, daß dieser Autor den von ihm geschaffenen Begriff durch die Forderung des Vorhandenseins von Plastiden belastet oder eingeengt hat, die fast nirgends nachgewiesen sind.

Solche leukophytische Arten finden wir bei den Chrysomonaden, Cryptomonaden, Volvocineen, Heterokonten, Eugleninen, Peridineen, Protococcaceen und Diatomeen, also bei sämtlichen Flagellatenreihen und davon abgeleiteten Einzellern (PRINGSHEIM 1932). Die leukophytischen eigentlichen Algen besitzen kein Stigma und im Gegensatz zu den meisten chlorophytischen auch keine stigmatisierten Schwärmerstadien.¹⁾ Ebenso fehlen bei den „Pilzen“ Augenflecke gänzlich, auch da wo Flagellatenstadien ausgebildet werden. Wir sehen darin ein Anzeichen größerer phylogenetischer Entfernung von den Algenvorfahren.

Zum Vergleich mit den ungefärbten Flagellaten sei ein Überblick über das Vorkommen des Stigmas bei den grünen gegeben (FRANZE 1893, S. 138f, PASCHER 1927, S. 34 und 1929, S. 395). Bei den Chrysomonaden fehlt es, wie es scheint, recht häufig; doch kann es auch wegen seiner Kleinheit übersehen worden sein. In der monographischen Bearbeitung von PASCHER (1913, S. 7ff) ist diese Frage nicht berührt, auch bei den einzelnen Gattungen und Arten nicht gesagt, ob sie ein Stigma haben. Einige farblose Arten besitzen es. Bei den Cryptomonaden fehlt der Augenfleck meist, nach FRANZE (1893, S. 159) stets, während PASCHER (1913, S. 96)

Anm. 1) Nur bei *Characium Chrysopyxidis* sind Stigmata vorübergehend zu sehen.

sagt: „Augenfleck bei einzelnen Formen vorhanden“, ohne aber anzugeben, bei welchen. Ich habe unter den zahlreichen Arten, die ich untersucht habe, leider noch keine gesehen, die einen Augenfleck besessen hätte.¹⁾ Er fehlt auch den leukophytischen Arten. Die Phytomonaden besitzen meist ein Stigma, das aber häufig der jungen Zelle noch fehlt (Vergl. oben S. 240). Von den apochlorotischen Arten haben verhältnismäßig viele das Stigma behalten. Was die Heterokonten anbelangt, so habe ich noch keinen rechten Überblick. Zunächst ist bei farblosen, stark abgeleiteten Flagellaten nicht immer zu entscheiden, ob sie Heterokonten oder Chrysomonaden darstellen, die ohnehin einander recht nahe stehen dürften. Außerdem finden sich auch bei grünen Formen ungefärbte Augenflecke (oben S. 240). Die Eugleninen besitzen wohl alle Stigmata, soweit sie grün sind, haben ja auch daher ihren Namen. Unter den chlorophyllfreien Eugleninen, auch Astasiaceen genannt, haben einige ein Stigma, und zwar nur solche, welche grünen noch verhältnismäßig nahe stehen. *Astasia quartana* (MOROFF) PRINGSHEIM, und die mit ihr wahrscheinlich identische *Ast. ocellata* KHAWKINE stehen *Euglena* näher als andere *Astasia*-Arten. *Astasia linealis* PRINGSHEIM gehört deutlich zur Gruppe der *Euglena acus*, und ganz ähnliche Arten sind mit gutem Recht von KLEBS (1883, S. 308) und DANGEARD (1930) zu *Euglena* gestellt worden. In derselben Sammelart *Euglena acus* gibt es nach KLEBS aber auch ungefärbte Varietäten ohne Augenfleck (PRINGSHEIM 1936, S. 78f). Ganz ähnlich ist es bei *Phacus pleuronectes* (ebenda, S. 74). Zu dieser Sammelart rechnet KLEBS (1883, S. 291 und 311) eine apochlorotische Form ohne Stigma, während ich eine sehr ähnliche mit Stigma gefunden habe (1936, S. 73f). Die ungefärbten *Phacus*- und *Trachelomonas*-Arten sind an ihrer Gestalt ohne weiteres als zu diesen Gattungen gehörig zu erkennen. Farblose *Lepocinclis*-Arten sind dagegen bisher nicht bekannt geworden. Die *Menoidium*-Arten, an die allenfalls gedacht werden könnte, stehen ihnen doch nicht ganz nahe und haben auch nie ein Stigma. Ähnlich ist das Verhältnis zwischen *Eutreptia* und *Distigma* (PRINGSHEIM 1936, S. 84). Bei Peridineen hat das Stigma eine sehr ungleiche Verbreitung. Auch unter ihnen gibt es farblose, stigmatisierte Arten.

Ich gebe im folgenden eine Liste der mit einem Augenfleck versehenen apochlorotischen Flagellaten.

- Chrysomonaden** *Amoeba stigmatica* PASCHER
Anthophysa Steinii SENN
Heterochromulina ocellata PASCHER, syn. *Oikomonas ocellata*
 SCHERFFEL
Monas vivipara EHRBG.

Anm. 1) Er kommt aber sicher vor, z.B. bei *Chroomonas* sp. (vergl. GEITLER 1922).

Volvocineen	<i>Hyalogonium Klebsii</i> PASCHER
	<i>Polytoma caudatum</i> KORSCHIKOFF
	„ <i>globosum</i> n. spec.
	„ <i>ocellatum</i> FRANZE
	<i>Polytomella (agilis) Dofleinii</i> PRINGSHEIM
	<i>Tetraphlepharis multifilis</i> (WILLE) PASCHER
	„ <i>obovalis</i> PASCHER
Protococcales	<i>Characium Chrysopyxidii</i> PASCHER ¹⁾
Eugleninen	<i>Astasia linealis</i> PRINGSHEIM
	„ <i>ocellata</i> KHAWKINE
	„ <i>quartana</i> (MOROFF) PRINGSHEIM
	<i>Euglena viridis</i> EHRBG. f. <i>hyalina</i> KLEBS
	„ <i>sanguinea</i> EHRBG. f. <i>hyalina</i> KLEBS
	<i>Hyalophacus ocellata</i> PRINGSHEIM
	<i>Trachelomonas reticulata</i> KLEBS
	„ <i>volvocina</i> EHRBG. f. <i>hyalina</i> KLEBS
Peridineen	<i>Gymnodinium vorticella</i> STEIN
	„ <i>hyalinum</i> ; syn. <i>Spirodinium hyalinum</i> (SCHILLER) LEMMERMANN

Auffallend ist auch die Tatsache, daß es mehrfach stigmatisierte und stigmenfreie Parallelformen gibt, worauf wohl BUDER (1917, S. 212) zuerst hingewiesen hat. Er meint, daß eine *Polytomella*, die er in Kultur hatte, vielleicht derselben Art angehörte wie DOFLEINS *Polytomella agilis*, obgleich ihr deren Stigma fehlte; es würde sich also um eine Varietät handeln, die den Augenfleck verloren hätte. Wirklich drückt sich die nahe Verwandtschaft der „Leukophyten“ mit bestimmten „Chlorophyten“ auch in der phylogenetischen, seltener ontogenetischen²⁾ und wohl nie phaenotypischen Labilität der Stigmenausbildung aus. D.h. von morphologisch einander sehr nahe stehenden Formen kann die eine mit einem Stigma versehen sein, die andere nicht. Der Umstand, daß das aber nur von apochlorotischen Arten bekannt ist, bedarf einer Deutung, die vielleicht in der von PASCHER (1929, S. 396) gewiesenen Richtung liegt, nämlich, daß ein Organ verschwinden darf, wenn es keine lebenswichtige Bedeutung mehr hat.

Das Vorhandensein eines Augenfleckes ist ein klonkonstantes Merkmal, wie auch STREHLOW (1929, S. 633) und MOEWUS (1935, S. 375) betonen. Ich möchte hinzufügen, daß das Fehlen des Augenfleckes wohl nie das einzige Merkmal ist, welches eine taxonomische Einheit von einer anderen unterscheidet. Das entspricht auch den Befunden an höheren Pflanzen und verhält sich ebenso mit dem Chlorophyll bei den apochlorotischen Arten gegenüber den grünen (PRINGSHEIM 1936 S. 80).

Anm. 1) PASCHER (1929, S.398) erwähnt eine weitere, offenbar farblose Art, *Characium hyalinum*. Mangels irgend welcher Angaben kann über diese nichts ausgesagt werden.

Anm. 2) Die jungen Zellen besitzen noch kein Stigma oder die alten verlieren es wieder.

Sehr zu beachten ist das was PASCHER (1927, S. 384) über das zuweilen späte Auftreten der Färbung des Stigmas bei der Entwicklung der *Polytoma*-Zellen sagt. Ich weiß aber nicht ob er recht hat, wenn er meint, es gäbe „*Polytoma*-Rassen“, die nur gelegentlich ein Stigma aufweisen. Ich konnte einen solchen Wechsel nie beobachten, und fand nur *Polytoma*-Stämme, deren Augenfleck sehr blaß und wie verwaschen ist. Ohne Klon-Kulturen läßt sich die Frage kaum entscheiden.

Obleich also noch einige Fragen nicht gelöst sind, will ich der Übersichtlichkeit wegen die einander sehr ähnlichen farblosen Arten mit und ohne Stigma einander gegenüberstellen.

	Ohne Stigma	Mit Stigma
Chrysomonaden	<i>Anthophysa vegetans</i> EHRBG.	<i>A. Steinii</i> SENN
Volvocineen	<i>Hyalogonium acus</i> PASCHER	<i>H. Klebsii</i> PASCHER
	<i>Polytoma caudatum</i> var. <i>astigmata</i> GRANDORI	<i>P. caudatum</i> KORSCHIKOFF
	„ <i>uvella</i> EHRBG.	<i>P. ocellatum</i> FRANZE
	<i>Polytomella citri</i> KATER	<i>P. agilis</i> (ARAGAO ?) DOFLEIN ¹⁾
	„ <i>caeca</i> PRINGSHEIM	= <i>P. Dofleinii</i> PRINGSHEIM
	<i>Tetrablepharis globulosa</i> SENN (?) ¹⁾	<i>T. multifilis</i> (WILLE) PASCHER
Eugleninen	<i>Euglena acus</i> EHRBG. f. <i>hyalina</i> KLEBS	<i>Astasia linealis</i> PRINGSHEIM
	<i>Phacus pleuronectes</i> DUJARD. f. <i>hyalina</i> KLEBS	<i>Hyalophacus ocellata</i> PRINGSHEIM

Sicher würde man noch zahlreiche andere hierher gehörige Flagellaten finden können um diese Liste zu erweitern, wenn die Kulturverfahren weiter ausgebaut würden. Erst durch die Untersuchung von Stämmen, die auf eine Zelle zurückgehen, kann auf diesem, auch für Probleme der Systematik wichtigen Gebiete Sicherheit geschaffen werden. Die Beschreibung der einzelnen Rassen und Arten wird eine feste Grundlage liefern und die Gedanken von PASCHER stützen. Besonders nötig und verlockend ist es bei den Gattungen *Polytoma*, *Tetrablepharis* und *Hyalogonium* diese Aufgabe in Angriff zu nehmen; aber auch die apochlorotischen Eugleninen, insbesondere *Euglena-Astasia* harren noch einer ausreichenden Bearbeitung. Das Beobachtungsmaterial ist also noch klein. Der

Anm. 1) Die Fragezeichen bedeuten: 1. Es ist nicht sicher, daß DOFLEIN die ARAGAO'sche *Polytomella*-Art gehabt hat, noch, daß diese wie die von D. ein Stigma besessen hat. 2. *Tetrablepharis globulosa* ist nicht ausreichend beschrieben, um zu erkennen, ob sie nicht vielleicht doch ein Stigma besessen hat. Ein Zweifel besteht ferner noch in Bezug auf *Anthophysa*. Alle in zahlreichen Kulturen aufgekommenen Klone wiesen bei genauerer Untersuchung ein Stigma auf, das aber zuweilen etwas schwer erkennbar war. Das Stigma ist das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Arten, sodaß also die stigmense EHRENBERG'sche Art unsicher geworden ist. (Dissertation TEICHMANN, Prag, Deutsche Universität 1936).

Erweiterung stehen vorläufig noch Hindernisse entgegen, indem in meinen Anhäufungszuchten immer wieder die gleichen Formen auftreten, sodaß also für die anderen die richtigen Vermehrungsbedingungen erst zu suchen sind, und ferner, daß viele leukophytische Arten in Reinkultur noch nicht gedeihen wollen.

III. Physiologisches

Die rote Farbe des Stigmas legte den Vergleich mit den einfachsten Augen der Tiere so nahe, daß die Bezeichnung Augenfleck auftrat, lange bevor man über die physiologische Bedeutung dieses Gebildes irgend etwas wußte. Es ist eine merkwürdige Tatsache, daß die maßgebenden Forscher sich Jahrzehnte lang sträubten die Funktion des Stigmas als Lichtsinnesorgan anzuerkennen und die verschiedensten Umwege einschlugen um eine andere Lösung zu finden.

Auch ich bin diesem Einfluß unterlegen (PRINGSHEIM 1912a, S. 193). PFEFFER (1904, S. 774) sieht in der Funktion des Augenfleckes eine bloße Vermutung. JOST (BENECKE-JOST 1923. Die Wörter Stigma und Augenfleck fehlen im Register) schildert mit Zurückhaltung die Lichtschirmtheorie. Bei HARDER (1936, S. 306) erst finden sich völlig zutreffende Angaben. In allen Darstellungen der Reizphysiologie tritt die Behandlung der Taxieen gegenüber der der Nastieen und Tropismen sehr zurück, nicht nur an Umfang, sondern vor allem an geistiger Durchdringung. Am stärksten ist das in der letzten Bearbeitung, bei WENT (1931, S. 442) zu bemerken.

Sehr langsam und vorsichtig haben sich die Physiologen dem reizvollen Augenfleckproblem genähert. Es ist z.B. eigenartig, daß in STRASBURGER's klassischer Phototaxis-Arbeit über die „Wirkung des Lichts und der Wärme auf Schwärmsporen“ (1878) bei aller Reichhaltigkeit nur ganz nebenbei (S. 42) des roten Punktes gedacht wird, wobei der Verf. zu dem Schluß kommt: „Die phototaktischen Eigenschaften der Schwärmsporen scheinen an das Protoplasma als solches und nicht an einen bestimmten Farbstoff in demselben gebunden zu sein.“ Diesen Schluß zog er aus der bedeutsamen Beobachtung, daß auch völlig ungefärbte Schwärmer auf Licht reagieren können.

Auch ENGELMANN (1882) leugnet auf Grund von Versuchen mit *Euglenen* die Bedeutung des Stigmas für die Phototaxis. Er sagt (S 397): „Meine anfängliche Vermutung aber, daß der Pigmentfleck die Stelle näher anweist, an der die Lichtperzeption zustande kommt, hat sich nicht bestätigt“. Gleichwohl behält er die Mitwirkung des Fleckes im Auge, wenn er auch das farblose Plasma vor dem Stigma als lichtempfindliches Organ auffaßt.

KLEBS (1883, S. 263) drückt sich mit dem ihm eigenen biologischen Instinkt schon etwas bejahender aus: „So sprechen Gründe morphologischer wie physiologischer Art dafür den Augenfleck als ein bei der Lichtempfindung mitwirkendes Organ anzusehen, wenn auch ein direkter Beweis noch nicht geliefert ist.“

Einen solchen wartet FRANZE nicht erst ab. Für ihn ist die Funktion ohne weiteres zu erkennen. Seine Angaben über die durch Linsenwirkung besonderer lichtbrechender Körperchen bedingte Augenähnlichkeit der Stigmata und über die psychischen Fähigkeiten der Flagellaten haben keinen Anklang gefunden. Man begreift das, wenn man liest: „Die Hauptaufgabe der Stigmata besteht jedenfalls darin, die Richtung des Lichtes und eventuell der Wärme zum Bewußtsein zu bringen, um so dem hohen Sauerstoffbedürfnis der Mastigophoren entgegen zu kommen“ (1893, S. 154). Die Beiträge des Verf. zum Thema Phototaxis können wir daher hier übergehen, obgleich er vielleicht der erste war, der der Wahrheit nahe gekommen ist.

Der nächste Schritt über ENGELMANN hinaus ist die Theorie von JENNINGS (zuerst 1905, hier nach 1910, S. 213). Nach ihm soll ein am Vorderende liegender Plasmabezirk lichtempfindlich sein und auf Grund der wechselnden Beschattung durch den Körper den Geißelschlag so beeinflussen, daß dadurch bestimmte Bewegungen zustande kommen. Das Stigma spielt dabei höchstens eine nebensächliche Rolle. Ich selbst habe dann (PRINGSHEIM 1912a, S. 193) den Augenfleck auf Grund eines Vergleiches mit den einfachsten Augen der Tiere als ein Gebilde betrachtet, welches Seitenlicht abzuhalten und die Lichtwirkung zu lokalisieren hat. Ähnliches hatte schon HABERLANDT (zuerst 1909, S. 568) angedeutet. Nicht viel anders ist das Ergebnis der vorsichtigen Überlegungen von BUDER (1917, S. 210). Im Ganzen ist diese „Lichtschirmtheorie“, wie ich sie zuerst aufgestellt habe, eine notwendige Umformung der Lehre von JENNINGS gewesen.

MAST hat diesem scharf widersprochen und ist zu ähnlichen Auffassungen gekommen wie FRANZE. Er nimmt an (z.B. 1927, 1932)), daß der Augenfleck ein verwickeltes Organ darstelle, und daß die eigentliche, lichtempfindliche Substanz eine Schicht in der Höhlung der roten Schale sei. Bei den koloniebildenden Arten, z.B. bei *Volvox*, soll das wirksame Licht sogar erst durch den Pigmentschirm auf die lichtempfindliche Stelle reflektiert und konzentriert werden. MAST hat mit JENNINGS und meiner alten Auffassung gemein, daß die perzipierende Stelle nicht der Pigmentfleck ist. Damit ist die Lage des wirksamsten Gebietes im Spektrum, wie wir sehen werden, schwer in Übereinstimmung zu bringen.

Diese ist annäherungsweise zuerst von OLTMANNS (1917) bestimmt worden, der mit Hilfe verschiedener Spaltweite des ENGELMANN'schen Mikrospektralapparates die stärkste Ansammlung für *Euglenen* im Blaugrün bei 460–500 $\mu\mu$ fand, während *Chlamydomonas* „mehr auf Grün gestimmt“ war.

OLTMANN'S (1917, S. 325) sieht hier eine Parallele zu den Ergebnissen von BLAAUW (1909), der für den Phototropismus von *Phycomyces* das Maximum bei 495 $\mu\mu$ fand.

Die Ergebnisse von MAST (1917) über die wirksamen Strahlen bei der Phototaxis sind schon etwas genauer, indem er die Intensität des Lichtes in den verschiedenen Spektralgebieten wenigstens rechnerisch zu berücksichtigen trachtet. Wenn er auch für verschiedene Objekte ziemlich weit auseinanderliegende Maxima zwischen 465 und 525 $\mu\mu$ fand, so liegen doch auch sie alle um 500 $\mu\mu$ herum, also im Blaugrün.

Am exaktesten sind z.Zt. die Ergebnisse von LUNTZ (1931), der die absoluten Energie-Schwellenwerte in verschiedenen Spektralgebieten gemessen hat. Nachdem schon LAURENS und HOOKER (1917 und 1920) festgestellt hatten, daß die Präsentationszeit im Blaugrün am kürzesten ist, bestätigen die Ergebnisse von LUNTZ den hohen Reizwert dieser Region des Spektrums dadurch, daß bei der Wellenlänge 492 $\mu\mu$ die geringste Energiemenge zur Erzielung einer Ansammlung phototaktischer Flagellaten mit Stigma nötig ist, und daß auch die Bewegungsschwelle dort am tiefsten liegt. Daraus zieht LUNTZ wohl mit Recht den Schluß, daß der Pigmentfleck die reizaufnehmende Stelle ist, weil seine Farbe komplementär zu den wirksamsten Strahlen sei. Genaueres ist bei ihm darüber auffallender Weise nicht gesagt. Er spricht nur von einem rötlichen Pigmentfleck, der rotes Licht durchlassen, blaugrünes verschlucken muß (1931, S. 89). Für *Astasia (ocellata) quartana* haben wir aber festgestellt, daß es sich um reines Carotin handelt (PRINGSHEIM und MAINX 1926, S. 591). Man darf wohl annehmen, daß sich andere Arten ebenso verhalten. Carotin besitzt nach WILLSTÄTTER außer dem Streifen um 430 $\mu\mu$ herum ein Absorptionsmaximum im Blaugrün bei der F-Linie, die bei 486 $\mu\mu$ liegt. Das ist eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Wirkungsmaximum bei Flagellaten mit Augenfleck, das bei 492 $\mu\mu$ liegt.

Wir haben heute auch für den von OLTMANNS (1917, S. 325) gezogenen und sogar durch Wiedergabe einer Abbildung unterstützten Vergleich zwischen phototaktischen und phototropischen Organismen in Bezug auf den spektralen Wirkungsbereich exaktere Unterlagen als er und finden, daß es überraschend gut stimmt.

Zunächst hat OLTMANNs im Text das phototropische Maximum von *Phycomyces* und *Avena* verwechselt. Die Ähnlichkeit mit dem ersteren, welches bei BLAAUW für $495\ \mu$ angegeben ist, wäre also größer als die für „höhere Pflanzen“, da *Avena*-Keimlinge ihr Maximum im Indigo bei $467\ \mu$ haben sollen. Auf die vielfachen neueren Untersuchungen über diese Frage gehe ich hier nicht ein (Vergl. CASTLE 1931, S. 710).

Die Übereinstimmung zwischen Flagellaten und *Phycomyces* beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von Carotinfarbstoffen in beiden Fällen, wie sie auch CASTLE (1935, S. 225) für *Phycomyces* Sporangienträgern annimmt. Die aus solchen gewonnene Lösung hatte Absorptionsmaxima bei 449 und $475\ \mu$. Das phototropische Maximum setzt er bei 429 – $448\ \mu$ an (1931, S. 709); doch ist erst bei 477 – $495\ \mu$ wieder eine Messung vorgenommen worden, sodaß das Maximum auch bei größerer Wellenlänge liegen kann. BLAAUW's Bestimmungen, die auf der Messung der Präsentationszeit beruhen, sind vielleicht für unsere Zwecke brauchbarer. Er fand ein Maximum bei $495\ \mu$, während bei 450 und $550\ \mu$ viel längere Präsentationszeiten festgestellt wurden. Das stimmt mit dem Maximum bei $492\ \mu$, das LUNTZ fand, fast zu gut überein. Jedenfalls liegen alle mit dem Vorhandensein von Carotin zusammenhängenden Werte im Blaugrün. OLTMANNs hat also etwas richtiges vermutet. Er ist aber an der hier vorgetragenen Deutung vorbei gegangen, denn er meint (1917, S. 310): „Scheint mir somit ein Beweis gegen die Lichtfunktion des Augenfleckes nicht vorzuliegen, so ist allerdings noch weniger ein solcher für dieselbe gegeben.—Man wird dann wohl auch fragen müssen, ob die Lichtempfindlichkeit der *Euglenen*, *Chlamydomonaden* usw. an bestimmte Farben gekettet sei, wobei zuerst an gelbe und rote zu denken wäre.“

Man wird also heute geneigt sein, dem Stigma eine wichtige Rolle bei der Phototaxis zuzuschreiben. Um so bemerkenswerter ist die Tatsache, daß es auch phototaktische Schwärmzellen ohne Stigma gibt. Da sind zunächst die schon von ENGELMANN (1888) als lichtempfindlich erkannten Purpurbakterien zu nennen, welche im ganzen Körper gleichmäßig verteilte Carotinfarbstoffe enthalten und bei einseitigem Lichteinfall keine bestimmte Schwimmrichtung einhalten. Echte Phototaxis sollen dagegen die Zoosporen von *Polyphagus Euglenae* und von *Rhizophlyctis* (*Chytridium*) *vorax*, also zwei Chytridiaceen besitzen (STRASBURGER 1878, S. 13, FULTON 1906, ROBINSON 1914, WAGER 1914) Augenflecke scheinen diese farblosen Schwärmer nicht zu haben; wenigstens wird nirgends etwas davon erwähnt.

GWYNNE-VAUGHAN und BARNES (1927, S. 35) sprechen in ihrer

eingehenden Bearbeitung wohl von der Phototaxis, bringen aber an Stelle von physiologischen Tatsachen nur teleologische Vermutungen. Auch bei der Besprechung der Zoosporen (S. 50) findet man nichts genaueres über ihren inneren Bau.

Gewöhnlich wird im Anschluß an die Chytridiaceen auch der Phototaxis einer *Bodo*-Art gedacht, die ROTHERT (1901, S. 371f) beobachtet, aber nicht beschrieben hat. Diese befällt *Chlamydomonas*-Arten und saugt sie aus. „Die *Chlamydomonas* war unter den herrschenden Bedingungen prosphototaktisch; die noch nicht festgesaugten, lebhaft beweglichen Exemplare des *Bodo* waren es gleichfalls, und zwar in noch höherem Grade. Im Hängetropfen der Feuchtkammer wanderten sie fast geradlinig dem Fensterrande zu und reagierten sehr präzise auf jede Drehung des Präparates.“ Diese Beschreibung legt den Verdacht nahe, daß diese *Bodo*-Art eine Chrysomonade mit Stigma gewesen ist. ROTHERT scheint darauf nicht geachtet zu haben, vielleicht in der Meinung, daß farblose Flagellaten keinen Augenfleck haben können, der bei schwacher Vergrößerung leicht übersehen werden kann. Dieselbe Möglichkeit bleibt auch noch für die genannten Chytridiaceen. Eine neue Untersuchung wäre sehr interessant.

Selbst wenn auch diese phototaktischen Objekte ein bisher übersehenes Stigma besäßen, so blieben immer noch die Cryptomonaden übrig, welche mindestens teilweise bestimmt keines haben und dennoch der Lichtrichtung folgen. Die verschieden gefärbten *Cryptomonas*-Arten und Verwandten scheinen sämtlich phototaktisch zu sein (STRASBURGER 1878, S. 12 und 13, JENNINGS 1910, S. 216, ULÉHLA 1911a, S. 668f, PRINGSHEIM 1912b, S. 361). JENNINGS sagt darüber: „Bei *Cryptomonas ovata*—hat der Verf. beobachtet, daß die Lichtreaktion ebenso wie bei *Euglena* vor sich geht.“ Was den Anschein anbetrifft, so kann ich das aus eigener Erfahrung bestätigen, sowohl was die gerichtete, wie die Schreckbewegung anbelangt. Zu den Cryptomonaden gehören aber auch die gänzlich, auch in größeren Ansammlungen für unser Auge ungefärbten *Chilomonas*-Arten, die keinen Augenfleck besitzen. Auch sie sind phototaktisch. Zwar waren die Arten, welche STRASBURGER (a.a.O.) unter diesem Namen anführt, mit grünlichen bzw. bräunlichen Chromatophoren ausgestattet, gehörten also nach unser heutigen Benennung wahrscheinlich zu *Cryptomonas*; aber auch die echten apochlorotischen beiden *Chilomonas*-Arten schwimmen unter geeigneten Bedingungen in der Lichtrichtung. Das hat auch LUNTZ (1931, S. 71, 82, 90) beobachtet, der ein Wirkungsmaximum im langwelligen Ultraviolett bei 366 μ feststellte. Dieses kommt übrigens als sekundäres Maximum auch bei den mit Stigma versehenen Flagellaten vor und wird

von LUNTZ einer allgemeinen plasmatischen Lichtreizbarkeit zugeschrieben.

Damit ist allerdings nur ein Anfang zur Lösung des Stigmenproblems gemacht. Der Fall der Cryptomonaden macht es vorläufig noch sehr schwierig. Die allgemeine plasmatische Lichtempfindlichkeit reicht bei keinem stigmatisierten Flagellaten aus um die Phototaxis zu erklären oder zu bewirken. Sie soll es aber bei den Cryptomonaden tun. Allerdings ist bei *Chilomonas* nach LUNTZ (S. 83) die Schwelle für das wirksamste Licht sehr hoch. Das erklärt aber wieder nicht die Phototaxis gegen ultraviolett-armes Tageslicht in einem Zimmer. Weitere Untersuchungen wären also sehr erwünscht, umsomehr als LUNTZ wegen Materialmangels seine Beobachtungen an *Chilomonas* abbrechen mußte. Er sagt (S. 90): „Ob auch Strahlen des sichtbaren Spektrums diese Fähigkeit besitzen (d.i. bei *Chilomonas*, so wie die ultravioletten von 366 μ Phototaxis zu bewirken) soll den Gegenstand späterer Untersuchungen bilden“.

Der Unterschied im spektralen Wirkungsmaximum zwischen den phototaktischen Arten mit und ohne Stigma und die bedeutend niedrigere Energieschwelle der ersteren zeigen klar die große Bedeutung des roten Fleckes für die Lichtreizbarkeit. Worin sie besteht, kann man aber daraus nicht erkennen. Vielmehr sind diese Ergebnisse an sich ebensogut mit der Lichtschirm- wie mit der Eigenempfindlichkeitstheorie des Stigmas vereinbar, denn in beiden Fällen könnte die Wirkung bei denjenigen Strahlen am stärksten sein, die am meisten absorbiert werden,—wenn man zunächst einmal von der Eigenabsorption des lichtempfindlichen Protoplasmas im ersteren Falle absieht. Aber das darf man eben nicht. Man kann heute nicht mehr dem Protoplasma einfach die Eigenschaften zuschreiben, die man gerade für die Erklärung einer Erscheinung braucht. Und es ist höchst unwahrscheinlich, daß das hypothetische sensible Plasma bei der fraglichen Wellenlänge stark lichtempfindlich ist. Erst im Ultraviolett liegt ein Wirkungsmaximum, wie man aus den Versuchen von LUNTZ mit *Chilomonas* und dem zweiten Maximum bei den anderen Objekten sieht, und wie auch sonst von „ungefärbtem“ Plasma bekannt ist.

Zu diesen Überlegungen, die gegen die Schirmtheorie sprechen, kommt noch der Befund von LAURENS und HOOKER (1920) hinzu, nach dem nicht nur die Präsentationszeit bei *Volvox* im Blaugrün am kürzesten ist, sondern dieses auch die stärkste photokinetische Wirkung auf Flagellaten hat (LUNTZ 1931). Auch für diese Lichtreizbarkeit muß also ein Aufnahmeorgan angenommen werden, welches in der genannten Gegend des Spektrums sein Empfindlichkeitsmaximum besitzt. Was anderes soll das aber sein als das Stigma?

So müssen wir also LUNTZ (S. 89) recht geben „daß im Pigmentfleck der grünen Protisten ihr Lichtsinnesorgan zu erblicken ist.“

Damit ist allerdings das Problem der Phototaxis nicht gelöst. Die Schirmtheorie, wie sie BUDER (1917, S. 214) am saubersten entwickelt hat, kann uns die Tatsache, daß trotz Rotation um die Längsachse eine gerichtete Bewegung zustande kommt, vorläufig besser verständlich machen als die Annahme, daß der rote Fleck selbst lichtempfindlich ist. So weit ich sehen kann, erscheint mir auch heute eine Unterschiedsempfindlichkeit die einfachste Annahme um trotz Drehung eine Einstellung in die Strahlenrichtung zu bekommen (PRINGSHEIM 1912b, S. 345 ff). Ist das Stigma selbst das perzipierende Organ, so bleibt wohl nichts anderes übrig als anzunehmen, daß „Ruhestellung“ gegeben ist, wenn der Augenfleck in der Richtung des Lichtes steht, wenn er also möglichst wenig Licht auffängt. Jede Abweichung, die zu einer stärkeren Absorption führt, müßte also einen seitlichen Geißelschlag und darauf eine Wendung des Körpers bewirken. Auch müßte die Beleuchtung des Stigmas von innen eine andere Wirkung auf die Geißelbewegung haben als die von außen, oder andere Hilfsannahmen müßten gemacht werden.

Da morphologische Beziehungen zwischen Stigma und Geißeln nicht bekannt sind, und da meist auch auf die genaue Stellung des Stigmas während der geradlinigen oder seitlich abbiegenden Schwimmweise nicht geachtet worden ist, so fehlen noch die Grundlagen zur Beurteilung dieser Annahmen. Jedenfalls ist die eingehende Berücksichtigung des Baues der verschiedenen phototaktischen Schwärmzellen für jede einschlägige Überlegung unentbehrlich (PRINGSHEIM 1912b, S. 363).

Wenn wir zusammenfassen, so müssen wir im allgemeinen noch heute FERD. COHN recht geben, wenn er sagt: „Bei den farblosen, mikroskopischen Organismen (Monaden, Cryptomonaden, Zoosporen der Pilze und Mycophyceae) ist ein Einfluß des Lichtes nicht vorhanden und tritt eine bestimmte Bewegungsrichtung nicht hervor“ (1866, S. 219), wie das ähnlich PASCHER (1929, S. 395 f) für das Vorhandensein des lichtperzipierenden Stigmas sagt; aber es gibt doch Ausnahmen. Deshalb drängt sich die Frage auf, wie es mit dem Verhältnis zwischen der Phototaxis und dem Vorhandensein eines Augenfleckes bei der Mehrzahl der Flagellaten steht, die mit den Cryptomonaden nach unserer heutigen Anschauung nicht so nahe verwandt sind, wie Luntz (S. 90) annimmt?

Die sich aufdrängende teleologische Beziehung, daß das Stigma für die Phototaxis nötig sei und diese die Zellen in die geeigneten

Assimilationsbedingungen führe, kann uns nicht genügen. Nur durch Vergleich und Versuch können wir weiter kommen, und da muß gesagt werden, daß außer *Cryptomonas* keiner von den stigmenlosen chlorophyllhaltigen Flagellaten auf Phototaxis hin untersucht worden zu sein scheint. Nur für Zoosporen von *Vaucheria* wird angegeben, daß sie kein Stigma und keine Phototaxis besitzen (STRASBURGER 1883, S. 42). Für *V. sessilis* kann ich das bestätigen. Eine bestimmte Anordnung der Keimlinge in den Glasgefäßen wäre nicht zu übersehen, und auch die Schwimmbahnen der großen Schwärmer können leicht verfolgt werden.

So richtet sich also jetzt unsere Wißbegier auf die stigmatisierten und stigmenlosen leukophytischen bzw. apochlorotischen Flagellaten. Hier haben wir nahe verwandte Arten mit und ohne Augenfleck, und ihr Verhalten muß für unser Urteil über die Bedeutung des Stigmas entscheidend sein.

Wenn das Stigma wirklich ein Augenfleck, also ein lichtempfindliches Organ der Zelle ist, so muß man erwarten, daß von nahe verwandten Arten diejenigen, welche den roten Fleck besitzen, immer die phototaktischen, die stigmenlosen dagegen ohne Lichtreizbarkeit sind. Eine Äußerung hierzu finden wir nur bei BUDER (1917, S. 121), welcher feststellte, daß nur solche *Polytoma*-Arten phototaktisch sind, welche einen Augenfleck besitzen, und daß auch *Polytomella agilis* mit Augenfleck auf Licht (negativ phototaktisch) reagierte (DOFLEIN 1916, S. 441), eine von BUDER selbst kultivierte Rasse ohne Stigma dagegen nicht.

Nach meinen Erfahrungen können wir BUDER's Beobachtungen verallgemeinern. Beim Herauspipettieren von Flagellaten, zwecks Anlegung von Speziesreinkulturen (PRINGSHEIM 1936) wurden hunderte von Kulturtropfen in Uhrschildchen durchmustert. Nicht selten kam es vor, daß die in den Anreicherungskulturen massenhaft vorhandenen Schwärmer nach kurzer Zeit scheinbar verschwunden waren. Das konnte zwei Gründe haben. Entweder die Zellen waren in den gewählten Flüssigkeiten geschädigt worden und lagen unbeweglich am Boden, oder sie hatten sich nach der Licht- oder Schattenseite begeben. Wurden die Zellen solcher phototaktischer Arten untersucht, so fand man stets mit Immersion ein Stigma,— mit alleiniger Ausnahme von *Chilomonas*. Umgekehrt konnte bei sämtlichen Arten, welche ein Stigma aufwiesen, unter günstigen Bedingungen auch Phototaxis beobachtet werden.

Als „günstig“ beurteile ich dabei solche Verhältnisse, unter denen eine lebhaftige Beweglichkeit herrschte, denn diese ist immer ein gutes Zeichen, auch in Bezug auf Vermehrungsfähigkeit. Schwimmgeschwindigkeit und phototaktische Reaktionsbereitschaft

stehen aber in einem kausalen Verhältnis zu einander, wie LUNTZ (1931, S. 67) richtig betont und ich schon früher (1912b, S. 345) ausgeführt habe. Bei träger Bewegung findet keine Richtungseinstellung statt, da es sich um eine zeitliche Unterschiedsempfindlichkeit handelt. Das paßt also theoretisch gut zusammen. Diese Schwimgeschwindigkeit im weiteren Sinne ist ihrerseits eine Funktion zweier Größen, nämlich der Gestrecktheit der Bahn, welche eine der Geraden mehr oder weniger genäherte Schraubenlinie darstellt, und der Schnelligkeit im engeren Sinne, mit der die Geißeln den Körper durchs Wasser treiben. Abhängig ist die Geschwindigkeit von der Helligkeit, dem Zustand der Zellen und der Beschaffenheit des Mediums. Durch Übertragung der Zellen in eine andere Flüssigkeit, wobei osmotische und H⁺-Konzentration maßgebend zu sein pflegen, lassen sich oft träge schwimmende Zellen aus älteren Kulturen fast augenblicklich in lebhaft bewegliche und dann, falls ein Stigma vorhanden, gut phototaktische verwandeln.

Bevor man einen Flagellaten also als nicht phototaktisch bezeichnet, muß man ihn unter verschiedenen Lebensbedingungen beobachtet haben. Ich hatte Gelegenheit die Phototaxis der folgenden leukophytischen Arten festzustellen: *Anthophysa Steinii*, *Oikomonas ocellata*, *Monas vivipara*, *Polytoma caudatum*, *Polytoma globosum*, *Polytoma ocellatum*, *Astasia linealis*, *Astasia quartana*, *Hyalophacus ocellata* (PRINGSHEIM 1936, S. 67 ff). Von einigen anderen der obigen Liste (S. 8) war die Phototaxis schon bekannt, soweit es sich um stigmenführende Arten handelt, während alle ohne Augenfleck nichts derartiges zeigten. In dieser Übereinstimmung sehe ich den zweiten Beweis der Funktion des Stigmas. Es wäre doch ein zu merkwürdiger Zufall, wenn von etwa 12 Art-Paaren immer die mit Augenfleck phototropisch wäre, die ohne ihn nicht, falls dies wirklich nichts mit der Funktion des Stigmas zu tun hätte.

Noch sicherer wäre natürlich der Beweis, wenn man Zellen, die kein Stigma haben, mit einem solchen versehen könnte und umgekehrt. Das Gelingen derartiger Versuche mit Hilfe des Kreuzungsexperimentes beschreibt MOEWUS (1935, S. 388 ff) für die Gattung *Polytoma*. Wie wichtig ein solches Material für die Probleme der Phototaxis wäre, leuchtet ein. Leider wiesen die Stämme von MOEWUS wohl Stigmata, aber keine Phototaxis(?) auf (a.a.O., S. 394).

Auffallender Weise scheinen alle saprophytischen Flagellaten negativ phototaktisch zu sein, wie das schon DOFLEIN (1916, S. 44) bei seiner *Polytomella* fand, während BUDER über die Richtung der Phototaxis bei stigmatisierten *Polytomen* nichts aussagt. Auch die zu Saprophytismus neigenden chlorophyllführenden Arten scheinen

meist negativ phototaktisch zu sein. Die ausgesprochen autotrophen dagegen sind bei hohen Lichtintensitäten negativ, bei geringeren positiv. Es gelang bei einigen, hinter einem Nordfenster bei schwachem Licht sich am Schattenrande sammelnden saprotrophen Arten nicht, sie durch noch geringere Helligkeit positiv zu machen. Bei Abschwächung der Beleuchtung wird die Ansammlung immer unsicherer und geht in ungerichtete Bewegung über.

Die ökologische Bedeutung der Lichtreizbarkeit ist bei den chlorophyllfreien Flagellaten recht unklar. Eine Beziehung zu der Form der heterotrophen Ernährung hat das Vorhandensein des Stigma nicht, denn ein solches kann bei saprophytisch, parasitisch und animalisch sich ernährenden Arten vorkommen. Die Funktionsfähigkeit des Stigmas steht in allen untersuchten Fällen fest. Ob es Arten gibt, bei denen das Stigma in der Rückbildung begriffen ist, müßte erst noch untersucht werden. So weit man es beurteilen kann, ist bei den heterotrophen Flagellaten die Chemotaxis besser geeignet sie in geeignete Lebensverhältnisse zu bringen als die Phototaxis. Aber auch die erstere ist bisher nur bei *Polytoma* genauer bekannt (PRINGSHEIM und MAINX 1926). Untersuchungen über die Lichtreizbarkeit apochlorotischer Flagellaten sind im Gange.

IV. Zusammenfassung

Das Stigma besteht aus einer plasmatischen Grundsubstanz, der carotinhaltige Öltröpfchen eingelagert sind. Selten fehlen diese, sodaß das Stigma vorübergehend oder dauernd ungefärbt erscheint. Es ist nicht möglich dem Stigma eine für alle Flagellaten und Algen-schwärmer gültige morphologische Deutung zu geben; doch sind in manchen Fällen Beziehungen zum Plastiden-Apparat festgestellt worden.

Fast alle chlorophyllhaltigen Flagellaten-Stadien besitzen ein Stigma. Bei ungefärbten ist es auf diejenigen Arten beschränkt, welche sich durch irgend welche Merkmale als nahe Verwandte von gefärbten erkennen lassen. Unter diesen apochlorotischen Flagellaten besitzt aber auch nur eine beschränkte Anzahl dieses Organ. Es wird eine Liste dieser Arten gegeben. Sie finden sich bei Chryso-, Phyto-, Eugleno- und Dinoflagellaten. Auch eine Liste der Parallelformen mit und ohne Stigma, die als getrennte Arten angesehen werden müssen, wird gegeben.

Die Bedeutung des Stigmas für die Phototaxis wird erörtert, und es werden Gründe dafür zusammengestellt, daß es selbst das reizperzipierende Organ ist. 1. Grund: Das Maximum der Lichtreizbarkeit liegt bei der gleichen Wellenlänge wie das Absorptionsmaximum des Stigmenfarbstoffes. 2. Grund: Die Arten mit Stigma

sind phototaktisch; ähnliche Arten ohne Stigma aber nicht. Ob das Stigma bei apochlorotischen Flagellaten eine ökologische Bedeutung hat, wissen wir nicht.

V. Schriftenverzeichnis

- Blaauw, A. H. 1909. Die Perzeption des Lichtes. Diss. Utrecht (Rec. trav. bot. Néerl. 5, 209).
- Buder, J. 1917. Zur Kenntnis der phototaktischen Richtungsbewegungen. Jahrb. wiss. Bot. 58, 105.
- Castle, E. S. 1931. The phototropic sensitivity of *Phycomyces* as related to wave-length. Journ. Gen. Physiology 14, 701.
- Castle, E. S. 1935. Photic excitation and phototropism in single plant cells. Cold spring harbor symposia on quantitative biology 3, 224.
- Chadefaud, M. 1932. Sur la cytologie d'un *Monas*, comparée a celle de quelques autres organismes flagellés. Ann. Protistologie 3, 181.
- Cohn, Ferd. 1854. Entwicklungsgeschichte der mikroskopischen Algen und Pilze. Verhandl. Leopold. Carolin. Akad., Breslau und Bonn 16 1, 103.
- 1863. Jahresher. Schles. Ges. vaterl. Kultur 1864, S. 102 und Bericht Vers. Naturf. und Ärzte in Hannover 1866, S. 219.
- Dangeard, P. A. 1901. Recherches sur les Eugléniens. Le Botaniste 8. sér., S. 97.
- Dangeard, P. 1930. Sur une Euglène incolore du groupe de l'*Euglena acus*. (*Eugl. acus* var. *pallida* nov. var.) Le Botaniste 22, 1.
- Doflein, F. 1916. Zuckerflagellaten. Biolog. Zentralbl. 37, 439.
- Engelmann, Th. W. 1882. Über Licht- und Farbenperzeption niederster Organismen. PFLÜGER'S Archiv 29, 387.
- 1888. Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht. Botan. Zeitung S. 1.
- Franze, R. 1893. Zur Morphologie und Physiologie der Stigmata der Mastigophoren. Zeitschr. wiss. Zoologie 56, 138.
- Geitler, L. 1922. Die Microphyten-Biocoenose der Fontinalis-Bestände des hunder Untersees. Revue Hydrobiologie 10, 682.
- 1934. Grundriss der Cytologie. Berlin.
- Grassé, P. P. 1926. Sur le stigma ou appareil parabasal des Euglènes. C.r. Soc. Biol. 28, 1012.
- Guignard, L. 1889. Développement et constitution des anthérozoïdes. Rev. gén. Botan. 1, 36.
- Gwynne-Vaughan, H. C. I. and B. Barnes 1927. The structure and development of the fungi. Cambridge.
- Haberlandt, G. 1909. Physiologische Pflanzenanatomie, 4. Aufl. Leipzig.
- Harder, R. 1936. in Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 19. Aufl. Jena.
- Jennings, H. S. 1910. Das Verhalten der niederen Organismen, Übersetz. MANGOLD. Leipzig und Berlin.
- Jost, L. 1923. in BENECKE-JOST, Pflanzenphysiologie. Jena.
- Kater, J. Mca. 1925. Morphology and life history of *Polytomella citri*. Biolog. bull. 49, 213.
- Klebs, G. 1883. Die Organisation einiger Flagellatengruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorien. Unters. Botan. Inst. Tübingen 2, 233.
- Laurens und Hooker 1920. Studies on the relative physiological value of spectral lights II. The sensibility of *Volvox* to wave lengths of equal energy content. Journ. exp. zool. 30.
- Luntz, A. 1931. Untersuchungen über die Phototaxis I. Zeitschr. vergl. Physiol. 14, 68.
- Lwoff, A. 1932. Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires Monogr. Institut Pasteur, Paris.

- Mangenot, G. 1922. Recherches sur les constituants morphologiques du cytoplasma des Algues. Arch. morph. gén. et expér. 9.
- Mast, S. O. 1917. The relation between spectral color and stimulation in the lower organisms. Journ. exp. zool. 22, 471.
- 1927. Structure and function of the eye-spot in unicellular and colonial organisms. Arch. Protistenkunde 60, 197.
- 1932. Orientation in light from two sources and its bearing on the function of the eye-spot. Zeitschr. vergl. Physiol. 16, 252.
- Moewus, Franz 1935. Über die Vererbung des Geschlechts bei *Polytoma Pascheri* und bei *Polytoma uvella*. Zeitschr. indukt. Abst.- und Vererbungslehre 69, 375.
- Oltmanns, Frieder. 1917. Über Phototaxis. Zeitschr. Botan. 9, 257.
- 1923. Morphologie und Biologie der Algen, Bd. III, Jena.
- Pascher, Ad. 1913. Flagellatae II, Süßwasserflora, Jena.
- 1916. Zur Auffassung der farblosen Flagellatenreihen. Ber. deutsch. bot. Ges. 34, 440.
- 1927. Flagellatae IV, Süßwasserflora, Jena.
- 1929. Eine neue farblose Chlorophyceae. Beih. botan. Ztbl. 44, 390.
- Pfeffer, W. 1904. Pflanzenphysiologie Bd. II, Leipzig.
- Pringsheim, E.G. 1912a. Die Reizbewegungen der Pflanzen, Berlin.
- 1912b. Das Zustandekommen der taktischen Reaktionen. Biolog. Zentralbl. 32, 337.
- 1932. Saprophyten. (Cryptogamen) Handwörterb. Naturw. 2 Aufl. 8.
- 1936. Zur Kenntnis saprotropher Algen und Flagellaten I. Arch. Protistenkunde. 87, 43.
- Pringsheim, E. G. und F. Mainx 1926. Untersuchungen über *Polytoma uvella*. Planta 1, 583.
- Rothert, Wl. 1901. Beobachtungen und Betrachtungen über taktische Reizerscheinungen. Flora 88, 371.
- 1914. Der „Augenfleck“ der Algen und Flagellaten—ein Chromoplast. Ber. deutsch. bot. Ges. 32, 91.
- Strasburger, Ed. 1878. Wirkung des Lichtes und der Wärme auf Schwärmsporen. Jena.
- Strehlow, K. 1929. Über die Sexualität einiger Volvocales. Zeitschr. Botan. 21, 625.
- Uhlela, Vl. 1911a. Ultramikroskopische Studien über Geißelbewegung. Biolog. Zentralbl. 31, 645.
- 1911b. Die Stellung der Gattung *Cyathomonas* From. im System der Flagellaten. Ber. deutsch. bot. Ges. 29, 284.
- Vischer, W. 1932. Experimentelle Untersuchungen mit *Mischococcus sphaerocephus*. Arch. Protistenkunde 76, 257.
- Went, F. A. F. C. 1931. in KOSTYTSCHIEWS-WENT Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. 2. Bd. Berlin.

**The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mother-cells
of *Trillium kamtschaticum* Pall. Mounted with
Saccharose Solution**

By

Kyojiro Shimakura

Hokkaido Imperial University, Sapporo

(With one plate)

Since the discovery by Prof. FUJII (1927) of the internal double-coiled spiral structure of chromosomes at certain meiotic stages of *Tradescantia (reflexa?)*, the same structure has been demonstrated by ISHII (1931), KUWADA and his collaborators (KUWADA 1932; KUWADA and NAKAMURA 1933, 1934; SHINKE 1934, KATO 1935, KATO and IWATA 1935, IWATA 1935), MATSUURA (1934) and DARLINGTON (1935) on several species of plants. The observation in all cases, however, has been confined to fixed and stained materials and the study for comparison on living material, if possible, as emphasized by FUJII himself, has been constantly needed.

The pollen mother-cells of *Tradescantia virginiana* as well as *T. reflexa* can continue to divide under the microscope, when they are mounted in anthral slime mixed with isotonic saccharose or some other sugar solution.¹⁾ In this case the chromosomes are very distinctly visible, but their minute internal structure can not be so clearly seen.

On the other hand, with the pollen mother-cells of *Trillium kamtschaticum*, prepared in a similar way, it was found by the writer in February 1936, that there might be a possibility of tracing the internal structure of the chromosomes without extreme difficulty. As the material was exhausted before exact determination of the tonicity of these cells and as it was not ascertained whether these cells could continue division when mounted in scanty anthral slime mixed with saccharose solution, the appearance of the chromosomes observed may not be taken as very strictly normal. But throughout

1) The writer had thought until recently (SHIMAKURA 1934, a, b; 1936) that these cells could divide also in pure isotonic sugar solution, i.e., in the complete absence of their natural medium, the anthral slime. Practically it is not easy at preparation to make a cell free from the slime (preserving the semipermeability of the plasma-membrane intact), but once isolated in almost pure saccharose solution the protoplast shrinks very much (pseudoplasmolysis—probably due to the abnormally high cH of the solution) and can hardly continue division; the point will be considered on another occasion.

repeated experiments the results were always definite and some of them seem to be worthy of note.

The cells were prepared, at room temperature (18–25°C.), as follows. A medium sized drop of 7.0 or 6.0 g./100 c.c. saccharose solution, both of which appeared to be not very much anisotonic,¹⁾ was placed on a clean cover-slip. A freshly cut piece of a young anther, 2–3 mm. long, was put in the drop and cautiously moved to and fro so as to make the drop adequately wide and thin, the content of the anther at the same time being gently squeezed out into the solution. The cover-slip was then inverted and so arranged, in the ordinary way, as to make the roof of a miniature moist chamber which was filled beforehand up to about $\frac{3}{4}$ (or $\frac{1}{2}$, in the case of micro-dissection) of its depth with the same solution as used in mounting the cells.

Thus prepared, the nuclei in some of the early prophase I cells are observed from the beginning very much swollen, while those in the other cells are not at all swollen and appear presumably normal. The cause of such abnormal swelling of some young prophase I nuclei is unknown at present. However, in the pollen mother-cells of *Tradescantia virginiana* as well as of *T. reflexa* a very similar swelling occurs in the nuclei of almost all the prophase I cells and this phenomenon is thought to be ascribable to the peculiar action of sugar solutions, easily penetrating the plasma-membrane on the one hand and enormously swelling the nucleus or chromosomes on the other. The *Tradescantia* pollen mother-cells at metaphase I and later stages also very easily suffer penetration and ensuing swelling of their chromosomes or nuclei by the action of sugar solution when their plasma-membranes are least injured mechanically or osmotically at preparation (cf. SHIMAKURA 1934, a, b; 1935, 1936).

In the *Trillium* pollen mother-cells at late prophase I, metaphase I, and anaphase I (the cells at stages later than these of meiosis have not been observed) mounted with saccharose solution of the above described concentration, on the contrary, such enormous swelling of the chromosomes as in the *Tradescantia* pollen mother-cells seems not to occur at all and the chromosomes are distinctly visible in all the cells in the field of view of the microscope (Figs. 1 and 3–11, Plate 7). With a view to determining whether this distinction is related to the property of the plasma-membrane or to that of the chromosomes, several cells at metaphase I of *Trillium* were torn up in the hanging drop with the aid of microneedles, but in no case were the chromosomes observed to swell in the least (Fig. 2, Plate 7).

1) Solutions of other concentrations, i.e., 16, 10 and 8 g./100 c.c. respectively, were also tested, but they all proved to be decidedly hypertonic.

Therefore, the distinction is probably related to the different reactions of the two kinds of, at least, metaphase I chromosomes brought in contact with saccharose solution, mixed with variable amounts of their respective anthral slime.

In the cells at metaphase I of *Trillium kamtschaticum* the five gemini, *a*, *b*, *c*, *d* and *e* as denominated by HAGA (1934), are clearly identifiable in polar view (Figs. 5 and 6) and their internal chromonema structure is also appreciable to some extent even with a medium power dry objective lens, such as ZEISS Apo 40, which exclusively was used in taking photomicrographs here. It may be readily perceived from Figs. 5 (cell *B*), 6 and 7 that the geminus *d* involves four major spirals, forming two pairs. In each pair the sister major spirals appear as if they were half inserted sideways into each other (though the actual movement must be reversed) and such is also the case of all the four remaining gemini, as may possibly be discerned by closer examination of chromosomes *a* and *b*, at least, in the above mentioned figures. At later metaphase I (Figs. 3 and 4) the sister major spirals disengage from each other, except around the insertion region, to complete the external appearance of a tetrad for each geminus.

At anaphase I the two components of a dyad appear usually more or less divergent from each other, except at the insertion region, and the major spiral involved in each monad is somewhat drawn out at the proximal portion, while the diameter of its coils appreciably increases at the more distal portion (Fig. 8, d_1 , d_2). At the end of this stage (Figs. 9–11) the major spirals are observed to be generally of larger diameter than at the preceding metaphase (Figs. 3–7), probably as a sign of the beginning of uncoiling. Here each major spiral reveals its double-stranded nature (indicated by long arrows), i.e., that it consists of twin chromonemata which are to be separated from each other at the first mitosis in the pollen grain. The minor spiral, in all probability, in each of the twin chromonemata which form together a major spiral, is also detectable by appropriate focusing (Figs. 10 and 11, indicated by long thick arrows). As the chromonemata are more refractive than the matrix substance of the chromosomes and the cytoplasm, they appear more or less glittering when brought slightly below (assuming that the microscope tube takes the upright position) out of focus of the observation lens system ("higher defocusing," so to speak) and darker when they are brought slightly above (or, correctly, inside) the best focus (observation by "lower defocusing"—so called, because in this case the microscope tube is slightly lowered with the fine adjustment). Such defocusing brings about more contrast in the image at the cost, inevitably, of the sharpest definition. Thus in the lower centre of

Fig. 10 one may see the double-coiled twin chromonemata with almost minimum contrast, as indicated by a long thick arrow i, but their minor spiral becomes less distinct by slightly higher defocusing as in Fig. 11 (arrow i), and hardly appreciable by considerable lower defocusing as in Fig. 9 (arrow i). In the upper right chromosome adjacent to the former in Fig. 9, one may see by slight higher defocusing an indication of twin chromonemata (arrow ii), which becomes obscure by further higher defocusing as in Fig. 10, but in turn there appears an indication probably of double coiling (arrow ii). With these facts in mind, various other parts of interest, indicated by long slender (twin chromonemata), short thick (minor coiling), or long thick (twin minor spirals) arrows in Figs. 8–11 will become probably more intelligible.

Now a question arises how far back this same structure, i.e., double-coiled twin chromonemata in a "monad" (as it appeared), can be traced in the earlier stages of meiosis. There are some indications of the existence of such a complicated structure already in the chromosomes at metaphase I, as shown by the above mentioned three kinds of arrows in Figs. 2 and 4–7. As concerns the images under consideration, the writer's interpretation may possibly be justified.

As to the chromosomes of prophase I, however, data are quite insufficient for any decisive statement here. In the chromosomes at late prophase I, images simulating the structure in question are sometimes observed (Fig. 1, indicated by arrows). But it is not clear to the writer whether they exactly correspond to the double-coiled twin chromonemata observable at the end of anaphase I or merely to the sister major spirals (each with minor coiling in itself, but no yet manifest split into twin chromonemata¹⁾), which are to deviate step by step from each other at metaphase I and anaphase I in the manner described above (p. 258).

The major coil numbers, roughly countable in some of the metaphase I chromonemata in Figs. 5 (cell B), 6 and 7 of the present paper, are decidedly smaller than (or about half as large as) those given by MATSUURA (1934, 1935) for the normal type of the same material as that used in the present work. Upon what does this inconformity depend?

The discussion of the questions as above and some other important problems concerning the internal structure of the chromo-

1) According to KUWADA's (1935) view, however, each geminus in the prophase I nucleus of the pollen mother-cell of *Trillium smallii* MAXIM. involves in itself eight chromonemata before the occurrence of double coiling. If this holds true also for the case of *T. kamtschaticum*, there is a possibility of the appearance of the split under consideration.

somes in meiosis is left for some future time, when, it is hoped, sufficient data may be at the writer's disposal.

Summary

1) Fresh pollen mother-cells at prophase I—anaphase I of *Trillium kamtschaticum* were observed in anthral slime mixed with an ample amount of 6.0 or 7.0 g./100 c.c. saccharose solution.

2) Cell division was inhibited after preparation, but the chromosomes were always distinctly visible, except in the earlier prophase I cells.

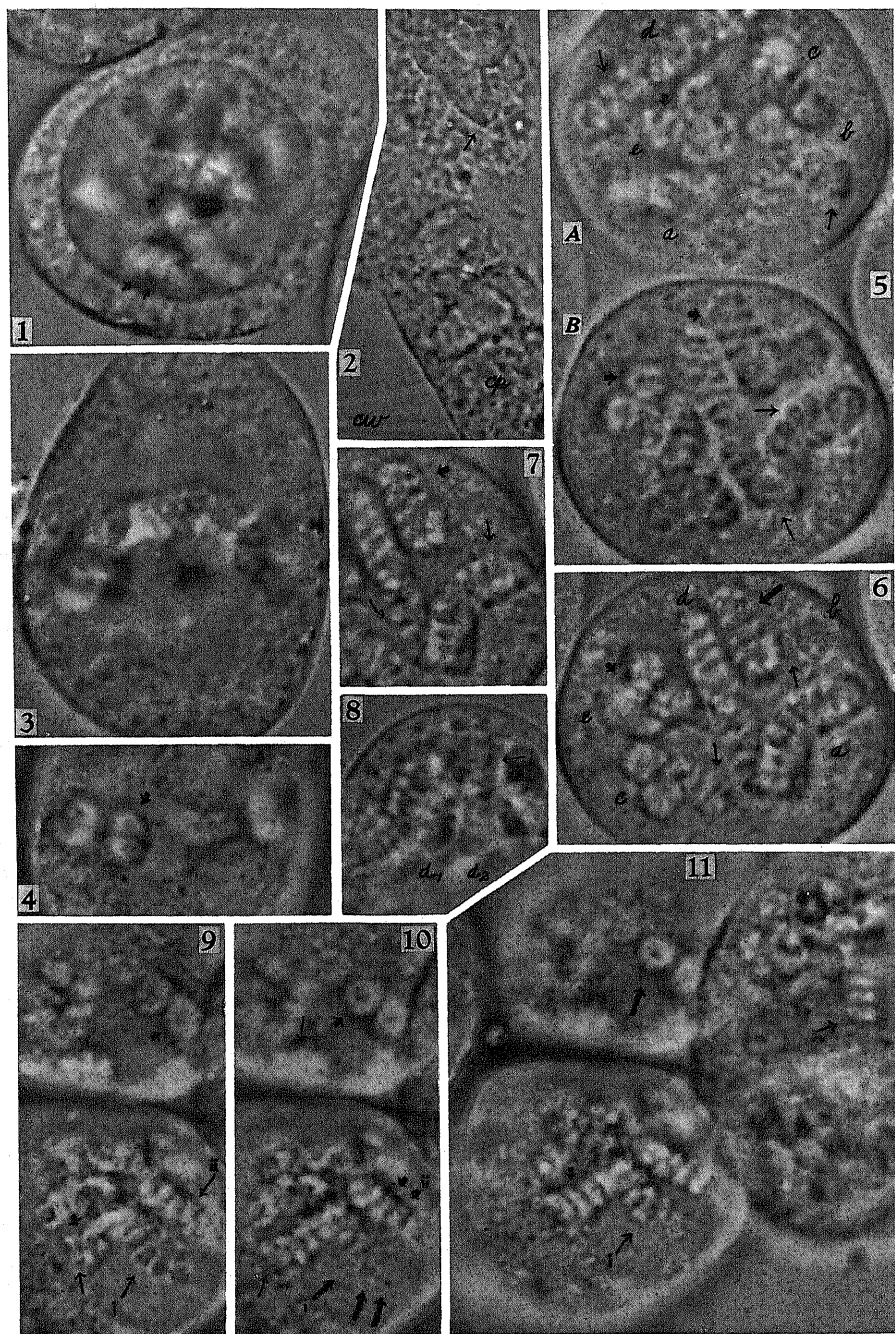
3) The internal structure of the chromosomes was examined in fresh state and the presence of double coiling in chromonemata at late prophase I—late anaphase I was demonstrated.

4) Indications for the existence of double-coiled twin chromonemata in a "single major spiral" or a "monad" at metaphase I and anaphase I were presented in some detail.

The writer wishes here to express his sincere gratitude to Prof. T. INUKAI, Prof. T. SAKAMURA, and Prof. H. MATSUURA for their encouragement and criticisms during the course of the present work. Acknowledgement is also due to the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan, with the aid of whose financial support the present investigation has been carried out.

Literature cited

- Darlington, C. D. 1935. The internal mechanics of the chromosomes. I. The nuclear cycle in *Fritillaria*. Proc. Roy. Soc., Ser. B, 118.
- Fujii, K. 1927. Recent progress in cytology and its method of investigation (in Japanese). Report of Jap. Ass. Adv. Sci., 2.
- Haga, T. 1934. The comparative morphology of the chromosome complement in the Tribe *Paridae*. J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ., Ser. V, 3.
- Ishii, T. 1931. On the structure of chromosomes (in Japanese). Jap. J. Gen., 7.
- Iwata, J. 1935. Chromosome structure in *Lilium*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ., Ser. B, 10.
- Kato, K. 1935. Chromosome behaviour in the interkinesis. I. Observation of pollen mother cells in *Tradescantia reflexa*. Ibid.
- and Iwata, J. 1935. Spiral structure of chromosomes in *Lilium*. Ibid.
- Kuwada, Y. 1932. The double coiled spiral structure of chromosomes. Bot. Mag. (Tokyo), 46.
- 1935. Behaviour of chromonemata in mitosis V. A probable method of formation of the double-coiled chromonema spirals and the origin of coiling of the chromonemata into spirals. Cytologia, 6.
- and Nakamura, T. 1933. Behaviour of chromonemata in mitosis I. Observation of pollen mother cells in *Tradescantia reflexa*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ., Ser. B, 9.
- and — 1934. Behaviour of chromonemata in mitosis II. Artificial unravelling of coiled chromonemata. Cytologia, 5.
- Matsuura, H. 1934. On the number of spiral gyres in the chromonemata (a preliminary note). Jap. J. Gen., 9.



Shimakura: The Chromonemata Observed in the Fresh Pollen Mother-cells etc.

- Shimakura, K. 1934 a. The divisions of the *Tradescantia* pollen mother-cells in saccharose solution (in Japanese). Report of Jap. Ass. Adv. Sci., 9.
- 1934 b. The capability of continuing divisions of the *Tradescantia* pollen mother-cell in saccharose solution. Cytologia, 5.
- 1935. The artificial swelling of chromosomes (in Japanese). J. Sapporo Soc. Agr. Forest., 26.
- 1936. The *Tradescantia* pollen mother-cells and their chromosomes immersed in solutions of various sugars (in Japanese). Jap. J. Gen., 12.
- Shinke, N. 1934. Spiral structure of chromosomes in meiosis in *Sagittaria Aginashi*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ., Ser. B, 9.

Explanation of plate 7

All the figures are photomicrographs of the pollen mother-cells of *Trillium kamschaticum* taken by a combination of ZEISS apochromatic objective 40 (N.A. 0.95), Leitz periplanatic ocular 20 \times , and LEITZ Mifilmca 1/3 \times at 170 mm. tube length. They were enlarged to $\times 1200$ at reproduction.

- Fig. 1. A late prophase I pollen mother-cell mounted in a hanging drop with and over 6.0 g./100 c.c. saccharose solution, taken 27' after preparation. Further explanation in the text.
- Fig. 2. Three gemini, cytoplasm (*cp*), and cell-wall (*cw*, a small part) from a ruptured metaphase I cell, taken 75' after preparation (in a hanging drop with and over 6.0 g./100 c.c. saccharose solution), and 3.4' after the rupture. Note that the chromosomes are considerably flattened (because the rupture was made at the thinnest margin of the hanging drop), but not at all swollen.
- Fig. 3. A late metaphase I cell mounted with and over 7.0 g./100 c.c. saccharose solution, in side view; taken 65' after preparation.
- Fig. 4. The same cell as above (middle part), at an elevated focus; taken 52' after preparation.
- Fig. 5. Two metaphase I cells *A* and *B* in polar view, mounted with and over 7.0 g./100 c.c. saccharose solution, taken 42' after preparation.
- Fig. 6. The cell *B* in the preceding figure, at an elevated focus; taken 44' after preparation.
- Fig. 7. The same cell as above, at a more elevated focus; taken 45' after preparation.
- Fig. 8. A part of an anaphase I cell in side view, mounted with and over 7.0 g./100 c.c. saccharose solution; taken 12' after preparation.
- Fig. 9. Later anaphase I cells mounted with and over 6.0 g./100 c.c. saccharose solution, in oblique polar view; taken 18' after preparation.
- Fig. 10. The same cells as in the preceding figure, at an elevated focus; taken 12' after preparation.
- Fig. 11. The same cells as above and a neighbouring one, at a slightly more elevated focus; taken 19' after preparation.

Cytological Studies on Certain Progenies of the Hybrid *Triticum Timopheevi* × *Triticum persicum*

By

Dontcho Kostoff

Now at the Academy of Sciences of USSR, Institute of Genetics, Moscow

Kihara's pioneer work upon the genom analysis in wheat hybrids and allied genera (chiefly *Aegilops* and partly *Secale*) threw light on the relationship amongst the species of the investigated genera. He showed first that the tetraploid species *Triticum Timopheevi* behaves cytologically unlikely the other tetraploid species in *Triticum*.

Hybrids between *Tr. Timopheevi* ($n = 14$) and *Tr. persicum* ($n = 14$) were produced and studied cytologically by Kihara (1934), Kihara and Lilienfeld (1934) and by Kostoff (1935 a, 1936 a, b, c, d). The former authors showed that in these hybrids the chromosomes of a whole genom (7) of *Tr. Timopheevi* form chiasmata with those of genom A of *Tr. persicum*, while only a variable part of the chromosomes of the other genom of *Tr. Timopheevi* form chiasmata with the chromosomes of the second genom (B) of *Tr. persicum*.

Our cytological investigations (Kostoff 1935a, 1936b) confirmed those of Kihara and Lilienfeld. We found that in the PMC (pollen mother cells) of the F_1 hybrids *Tr. Timopheevi* × *Tr. persicum* 10, 11, and 12 bivalent chromosomes were most frequently formed, but in some cases even 9, 13, and 14 bivalents were observed. Occasionally trivalents were seen too. Kihara and Lilienfeld found that „Es kommen 9–14 Bindungen vor, am häufigsten 12“.

The hybrids *Tr. Timopheevi* × *Tr. monococcum* ($n = 7$) formed usually 7 bivalent (genom A) and 7 univalent chromosomes. These data showed that *Tr. Timopheevi* has one genom (7 chromosomes) homologous with genom A of *Tr. monococcum* and of *Tr. persicum* while the other genom of *Tr. Timopheevi* is only partially homologous with genom B of *Tr. persicum*, or generally speaking, of the other species in the genus *Triticum*. This generalisation is made on the basis of extensive cytological studies of numerous tetraploid as well as pentaploid hybrids between *Tr. Timopheevi* and the other *Triticum* species (v. Kostoff 1936b).

Kihara and Lilienfeld (1934) called the second genom of *Tr. Timopheevi*—genom G, emphasizing its *individuality*, while we called

Some cytological observations on the progeny of *Tr. Timopheevi* × *Tr. persicum* hybrids

The data given in table 1 show that the most viable gametes formed by the hybrids have had 14 or 14 + 1 chromosomes (Some of them had one or more unusually small chromosomes that remind of fragments).

The plant with 41 somatic chromosomes (fig. 2) had a very peculiar new character that never has been observed in the genus

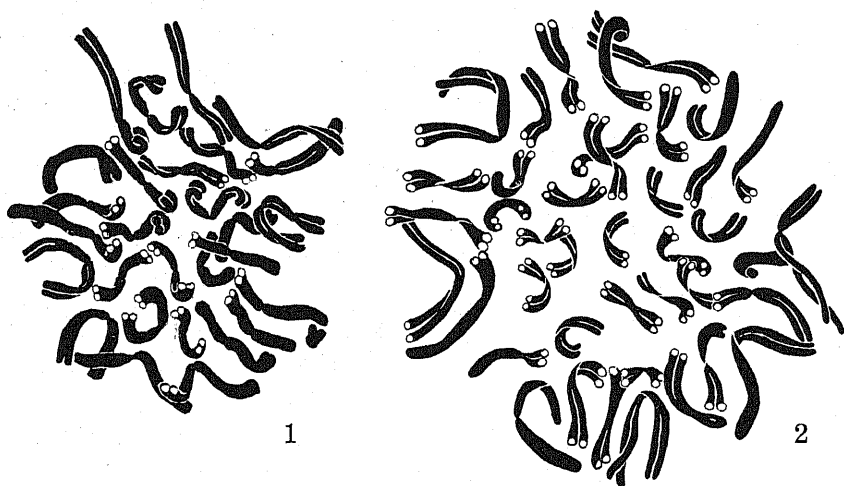


Fig. 1. Somatic plate from a F_2 (*Triticum Timopheevi* × *Tr. persicum*) plant (N) with 28 chromosomes and a small one (like fragment). Fig. 2. Somatic plate from a F_2 (*Tr. Timopheevi* × *Tr. persicum*) plant (Q) with 41 chromosomes.

Triticum. The basis of the spikes was covered with very long (ca. 2 mm.), soft trichomes, much longer than the "pubescence" at the same place in *Secale* species. It extended ca. 18 mm. The hybrid with 41 somatic chromosomes, which will be called here plant Q, had, however, much longer and very dense and soft trichomes, than *Secale* species. I never have seen such a character in wheat and in the allied genera. "Pubescence" below the spike in *Secale* has been transferred recently at the back-ground of wheat, but it appears just as in *Secale*. Plant Q has also very thick and coarse leaves like any polyploid plant. It has originated most probably from a gamete having 27 chromosomes and another having 14 chromosomes, or a gamete having 28 chromosomes (non-reduced) and another having 13 chromosomes. The former alternative, however, seems to be more probable, because a 13 chromosome gamete seems to be less viable than a gamete having 27 chromosomes, as the studies in other *Triticum* species hybrids have shown. A gamete with 27 or 28

chromosomes have been formed following non-occurrence of one of the meiotic divisions.

The plants having 28 or 29 somatic chromosomes and one or two fragments or small chromosomes have originated from fusion of gametes with $14 + 14$ or $14 + 15$ chromosomes, some having in addition one or two fragments or small chromosomes. But how the small chromosomes (or the fragments) have originated? We have mentioned above that they were seen in a few instance during the meiosis in the F_1 hybrids. Formation of fragments and shortened or elongated chromosomes was reported by various investigators (Darlington 1928, Avery 1930, Meurman 1928, Müntzing 1934, Kostoff 1935a, 1936b, Richardson 1936, etc.). Chromatid fragmentation was found in *Trillium* by Huskins and Smith (1935) and by Smith (1935) arising apparently through crossing-over in a heterozygous inverted segment.

The mode of origin of fragments in the interspecific hybrids was interpreted by Müntzing (1934) in studying *Crepis* interspecific hybrids and that of shorter and longer chromosomes by Kostoff (1935a) in studying triple wheat hybrids and wheat-rye hybrids. Both studies were carried out independently. A very extensive study on this subject was recently presented by Richardson (1936). She studied *Lilium* hybrids. It should be mentioned here, that it is generally accepted, that fragments without centromeres (spindle fiber attachment chromomere) get usually lost during the subsequent cell divisions, while newly formed short and long chromosomes (as shown in figs. 3 and 4) having a centromere get transmitted to the next

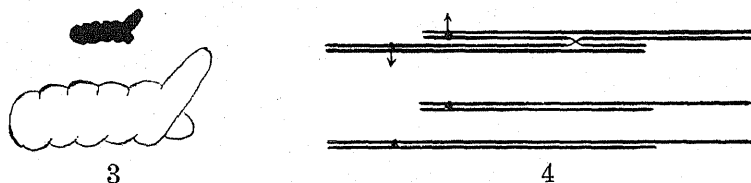


Fig. 3. Chromosome with unequal chromatids from the first early meiotic anaphase of plant Q. Fig. 4. Diagram showing how chromosomes with unequal chromatids (fig. 3) may arise, as a sequence of crossing-over between chromosomes of the component species with dislocated segments. It is given here only one way (of a number that are possible depending on the kind and place of dislocation and crossing-over) of formation of such chromosomes.

generation. We studied the problem in such an aspect (Kostoff 1935a, 1936a). Richardson (1936), on the other hand, studied the meiosis in *Lilium* hybrids very thoroughly and discussed a number of possibilities how fragments (acentric chromatids), chromatid-bridges (dicentric chromatids), and chromatids of various size (monocentric) originate in postulating segmental dislocations in the

pairing chromosomes and crossing-over on the basis of study of chiasma formation. She considered in her excellent paper: 1) inversions, 2) translocations, and 3) duplications, and the main sequences that occur following cross-overs, therefore, referring to her paper here, we shall not go into details in this matter. The formation, however, of shorter and longer chromatids, and further such chromosomes, a phenomenon observed in studying the meiosis in plant Q (with the 41 somatic chromosomes), should be briefly considered here.

When the homologous segments of the partially homologous chromosomes or of dislocated segment (or segments) in a chromosome do pair and crossing-over occurs in the pairing regions, the chromatids involved in the crossing-over may give rise to acentric, unequal monocentric and dicentric chromatids. In fig. 4 we give a simple diagram which shows how unequal monocentric chromatids may be formed following crossing-over in a chromosome pair (one of the partners having dislocated segments). This is not, however, the only way of formation of such new shorter and longer chromatids, that give rise further to strikingly shorter and longer chromosomes, observed in the subsequent generations in species hybrids (v. also Kostoff 1935a). In the case illustrated in fig. 4 a normal chromosome separation can occur and the cross-over chromatids give rise to one shorter monocentric and to one longer monocentric chromatid. The non-cross-over chromatids remain unchanged. The length of the newly produced chromosomes following such a chromosome conjugation depends exclusively on the point where crossing-over takes place, as well as on the type and position of the translocated segment, or homologous segment.

We may apply the same diagram to explain the origin of plants with definitely stated small chromosomes not only in *Tr. Timopheevi* \times *Tr. persicum* progeny, but also in the species hybrids (*Tr. dicoccum* \times *Tr. monococcum*) \times *Tr. vulgare* and their progenies, as well as in the progeny of wheat \times rye hybrids (*Tr. vulgare* \times *Secale cereale*) \times *Tr. vulgare*.

Since the short chromosomes (shorter than any one of the original parents) were found in the progenies and some of them are further transmitted into the next generations, each one of them should have a centromere, because, as the studies in other cases show, if they did not have a centromere, they should be lost into the cytoplasm during the cell division.

A very interesting question that appears here in connection with the formation of short chromosomes is: How these short chromosomes behave during the meiosis? For carrying out such a

type of studies I used two F_2 plants *Tr. Timopheevi* \times *Tr. persicum*, one having 30 chromosomes and one small one (plant M) and another having 28 chromosomes and a short one (plant N). A triple cross plant (*Tr. Timopheevi* \times *Tr. persicum*) \times *Tr. durum* was also taken into consideration, which had 28 chromosomes and a short one too (plant P). We first verified whether these plants really have short chromosomes in all cells of the root tips that could be examined and undoubtedly counted. This was very necessary, because sometimes the microtome knife may cut off the ends of only one or two chromosomes and the fragments can get lost and cannot be found on the preceding or subsequent sections. On the other hand acentric chromosomes (fragments) might occur only in a few cells. Therefore we studied a large number of somatic plates in the root tips from each plant (M, N, and P) and only those plates were taken into consideration which had a very distinct layer of cytoplasm above and below the ends of all somatic chromosomes of the plates. Plant M had roots with 30 as well as with 30 normal and one short chromosome. The other plants (N and P) had in all roots 28 chromosomes and a short one.

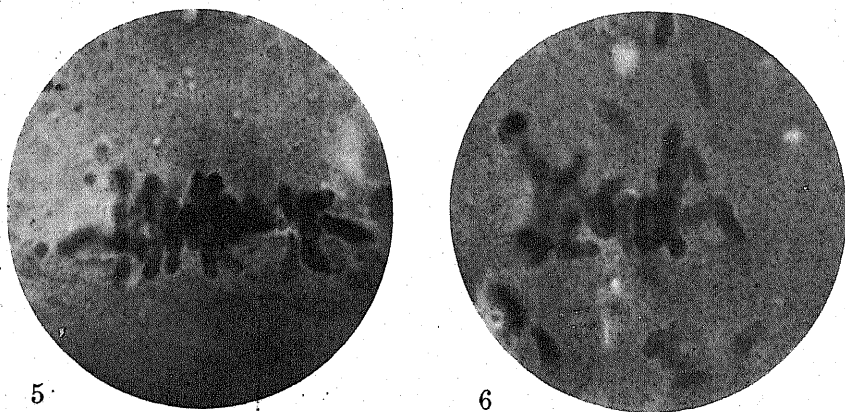
For studying the meiosis in these plants acetocarmine preparations were made from each one of them. Plant M had in the first metaphase of the PMC in 20 cells 12 bivalents and 6 univalents, in three cells 12 bivalents, one trivalent and 3 univalents; in 12 cells 13 bivalents and 4 univalents; in one cell 13 bivalents, one trivalent and one univalent, and finally in one cell 14 bivalents and 2 univalents. The small chromosome was not found in the PMC. It probably has been eliminated during the embryonal development or later during the development of the plant. The plant has irregular meiosis. It formed about 15–20% normal pollen. This plant had characters from both parental species, but those of *Tr. Timopheevi* prevailed (pubescence on the leaves and on the stems, the shape of the spikes, and the shape of the glumes). The plant was highly sterile.

Plant P had also only large chromosomes in the PMC during the first meiotic metaphase. It had in 18 cells 11 bivalents and 6 univalents, in 14 cells 12 bivalents and 4 univalents, in one cell 14 bivalents, and in one cell 11 bivalents, one trivalent and 3 univalents(?). (In the latter case we were not quite sure whether we had really a trivalent chromosome group or a bivalent + univalent. In fact we found a bivalent and to the end of one of the component chromosomes, another univalent was so directed that one gets the impression that it has been just separated from the bivalent group). Plant P was somewhat *durum*-like but a weak pubescence on the leaves, a

character from *Tr. Timopheevi*, was also present. The plant was highly sterile. It formed about 15% normal pollen.

Plant N had in the PMCs during the first metaphase the small chromosome found in the somatic cells. It has occasionally paired with a visibly normal chromosome and formed a dissimilar pair. In 46 cells such a dissimilar bivalent was found, while in 45 cells the short chromosome appeared as univalent. If we include this short chromosome in our statistical counts, the meiosis of plant N can be characterised in the following way: 7 cells had 10 bivalents, one trivalent, and 6 univalents, 3 cells had 10 bivalents and 9 univalents, 28 cells had 11 bivalents and 7 univalents, 3 cells had 11 bivalents, one trivalent, and 4 univalents, 21 cells had 12 bivalents and 5 univalents, two cells had 12 bivalents, one trivalent and two univalents, 13 cells had 13 bivalents and 3 univalents, one cell had 13 bivalents and one trivalent, and finally 9 cells had 14 bivalents and one univalent. In the last case the univalent chromosome was the shortest one. 5-6 pairs had usually two chiasmata during the first metaphase. One pair had only occasionally three chiasmata, while all the other bivalents had only one chiasma, terminal, or sub-terminal. The small chromosome in all PMC studied formed only one terminal chiasma with its dissimilar partner. A similar case was described by Huskins and Spier (1934) in studying some speltoids. Plant N was more *Tr. Timopheevi*-like; it was highly sterile, and had about 25% normal pollen.

A special interest attracted the meiosis (figs. 3, 5 and 6) of plant Q that had 41 somatic chromosomes. It represents an F_2 (*Tr. Timo-*



Figs. 5. and 6. Two PMCs during the first meiosis of plant Q.

pheevi \times *Tr. persicum*) plant, as it was mentioned above. In studying the ratio between the univalent and the conjugating chromosomes

we found in 6 cells 14 bivalents, one trivalent and 10 univalents, in 3 cells 14 bivalents, 2 trivalents, and 7 univalents, in one cell 13 bivalents, 3 trivalents and 6 univalents, in three cells 15 bivalents, one trivalent, and 8 univalents, and in two cells 16 bivalents and 9 univalents. Cells with quadrivalent chromosomes were also observed, but in these cells the ratio between the bivalents and the univalents was not possible to determine. We had very great difficulties in determining the number of the bivalents, trivalents and the univalents in this plant, because of the relatively great chromosome number. In some cases the preparations were distained by chloralhydrate solution in order to be able to distinguish and count the bivalent, trivalent, and the univalent chromosomes.

During the first early anaphase chromosomes with unequal chromatids were found. In two cases we have seen them very distinctly, while in one case they were not as distinct as in the other two, because of their position. We have drawn one of them (fig. 3) and tried to take a photomicrograph. Unfortunately, the latter was not successful. We showed, however, such a chromosome with unequal chromatids to our coworker Dr. M. L. Belgovsky and to some others. The appearance of chromosomes with unequal chromatids during the first early anaphase in the PMC can be interpreted on the basis of our diagram given in fig. 4, as well as that given before (Kostoff 1935a), as a sequence of crossing-over between chromosomes with dislocated segments. It should be mentioned here that the same results can be obtained, i.e. the appearance of chromosomes with unequal chromatids during the early anaphase, following crossing-over between two chromosomes dissimilar in length when they pair. The chromosomes, however, with unequal chromatids which we observed in plant Q does not seem to be a result of crossing-over between dissimilar chromosomes, because we have not seen such a distinctly dissimilar pair during the first metaphase. We searched for distinctly dissimilar pairs in about one hundred PMC during the first metaphase but we were not able to find such one.

In connection with the above reported observations we shall refer here again to the excellent paper by M. Margaret Richardson (1936), in which she is giving a series of possible chromosome reorganization following crossing-over between chromosomes with dislocated segments.

The above given observation indicates how chromosomes of various size may originate following interspecific hybridisation.

Plant Q formed about 20–25% normal pollen, but nevertheless, it was sterile. Its morphological appearance was described above.

In studying the mode of coiling in each arm of the somatic chromosomes in the species hybrids (considering all chromosomes in the somatic plates) we noticed the following combinations in the directions of coiling (R-right, L-left, c-centromere) and absence of coiling (N-neutral): NcN, NcR, NcL, RcR, LcL, and RcL. No statistical counts were made to determine exactly the frequency of the direction of coiling in one arm in respect to that in the other arm. We have the impression, however, that most of the short arms are neutral during the somatic metaphase, while the longer arms coil at random—to the left or to the right. We found in a few instances a reversion in the direction of coiling in the longer arm of a long chromosome. Such a change in direction of the chromatid coiling is given in fig. 2 (at the right side). We also found occasionally a reversion in the direction of chromatid coiling in one arm in the long somatic chromosomes of *Secale cereale*, *Secale ancestrale* and *Secale Vavilovi*. The change of the direction of coiling in *Secale* somatic long chromosomes occurs most frequently at the secondary constriction (IIc), namely NcRIIcL, or NcLIIcR, etc., but in a few instances we could not see a secondary constriction nevertheless the direction of the chromatid coiling was reverted in the following way: NcLR, or NcRL. Similar reversions were drawn by Lewitsky (1931) in *Secale cereale* (his fig. 8) for one arm of the III and VI chromosomes (NcRL and NcLR) without calling special attention to the fact. Sax (1936), however, in studying the direction of coiling in the chromosome arms of *Vicia Faba* in the soma, wrote: "No case was observed where the direction of relational coiling was reversed in the long arm, but in the short arm the direction was reversed on either side of the secondary constriction in several chromosomes" (p. 329). It is very desirable a more detail investigation of this problem. It may throw some light on the dynamics of crossing-over.

The pioneer work by Fujii (1926, 1931), Kuwada and his students (1932–1935), Nebel (1932–1936), Kaufmann (1926 and later), Darlington (1935 a, b, c, d), Maeda (1928), Shinke (1930, 1934), Sharp (1934), Huskins and Smith (1935), Matsuura (1934, 1935 a, b) Kato and Iwata (1935), Sax (1936), Satô and Sinotô (1935) and many others on the spiral structure of the chromosomes prepared a solid back-ground for further successful work in cytogenetics and especially for elucidation of the problem of crossing-over. We shall record here some observations on the occurrence of spiral structure in the univalent chromosomes. Spiral structure of the chromosomes during the meiosis in many cereals was observed very clearly in acetocarmine preparations. Both bivalent as well as

univalent chromosomes have spiral structure in the hybrids *Tr. Timopheevi* \times *Tr. persicum* during the first metaphase in the PMCs. Univalent chromosomes in *Nicotiana* haploids have also spiral structure during the diakinesis and metaphase. (It was visible in our preparations only during these two stages, but it does not mean that it is completely absent during other stages). The difference in the chromatid coiling in the univalent chromosomes in meiosis and that in the somatic chromosomes during the metaphase seems to be significant in respect to the number of spirals, the univalents having many more spirals than the somatic chromosomes during metaphase. One of the longest chromosomes in the haploid *Nicotiana Langsdorffii* ($n = 9$) had usually 1.5–2 half spirals in the somatic chromosomes, while in the pollen mother cells it had about 6 half spirals. We cannot answer now the question whether merely the "precocity" of meiotic prophase in the sense of Darlington (1932) is responsible for a delay of the uncoiling in the meiotic chromosomes, or there are some other forces that have caused a greater torsion in the meiotic chromosomes. Enormous contraction of the meiotic chromosomes during the metaphase suggests such a possibility.

We shall attempt to consider the formation of spiral structure in the univalent chromosomes in connection with the Darlington's neochiasmatype theory (1935). According to Darlington (1935c) "the fundamental properties of chromosomes" are the "*lateral attraction* and *longitudinal cohesion*" (p. 90). "The coiling represents a state of tension in the chromosomes which can be only due to opposition between the two forces maintaining the relative positions of the chromosomes: longitudinal cohesion and lateral attraction. The lateral attraction cannot be expected to cause relative rotation. It must be positionally specific and stable. But the longitudinal cohesion can do so since the chromosomes increase in length during the pachytene stage and therefore presumably uncoil their molecular spirals" (p. 94–95). He also assumed that the "longitudinal cohesion lapses when the chromosomes cross over; lateral attraction lapses when the chromosomes repel one another at diplotene" (p. 93). All these is said, however, for the bivalent chromosomes, i.e. for the relational coiling, but not for the chromatid coiling. Since the univalent chromosomes have a spiral structure (chromatid coiling), it seems logical to assume that the chromatid coiling in the univalent chromosomes is not an ultimate sequence from the forces regulating the relational coiling, i.e. the longitudinal cohesion and the lateral attraction that act until the diplotene in the pairing chromosomes. Chromatid coiling in the bivalent chromosomes is probably due to the same causes that induce chromatid coiling in the univalents. (The

number of the chromatid coils in the univalents in one unit length of the chromosomes does not seem to differ significantly from those of the bivalent chromosomes). Forces, assumed to explain the relational coiling in the bivalents, can be postulated, of course, in a similar way for the chromatid coiling too; one acting axially, while the other holding the chromatids together. The latter force seems to lapse in the partners of the bivalent chromosomes somewhat later than in the univalent ones, since the univalents divide occasionally during the first meiotic metaphase (chromatid separation), while the partners of the bivalents divide much later. But it is possible that some other additional causes may be involved at the different stages during the meiosis. Further investigations are necessary for the elucidation of the whole dynamics of the meiosis.

The extensive work by Janssens (1924), Belling (1928, 1931, 1933), Darlington (1932, 1935), Mather (1933 a, b, 1934, 1935), Creighton and McClintock (1931), Stern (1931), Huskins and his students (1934, 1935), Sax (1936), etc. have thrown light on the correlation between the genetic and cytological crossing-over. We can now speak with a great certainty that crossing-over should occur between the chromosome pairs forming chiasmata in the species hybrids, and on the basis of the cytological studies of meiosis in species hybrids a prognosis can be given whether characters of the one parental species can be transferred at the back-ground of the other one and *vice versa*. We shall mention here the works by Beadle (1932) and by Kostoff (1934) that contributed data on the same problem in studying species hybrids. In the case here described (*Tr. Timopheevi* \times *Tr. persicum*) the chromosomes of *Tr. Timopheevi* genom A form chiasmata with the chromosomes of *Tr. persicum* genom A, while most frequently a part of the chromosomes of *Tr. Timopheevi* genom β form usually chiasmata with the chromosomes of genom B of *Tr. persicum*. In the hybrid *Tr. Timopheevi* \times *Tr. persicum* only in exceptional cases 14 bivalents were found, consequently the characters located in the chromosomes of A genom can be much readily recombined than those located in the chromosomes of genoms B and β . *Triticum Timopheevi* is a species immune to a series of fungous diseases (various rusts, mildew, etc.) and some flies. Its immunity can be much easily transferred to the other cultivated wheat species if the genes for immunity are located in the chromosomes of genom A than in those of genom β .

The majority of the investigators studying the cytological basis of crossing-over assume a "breakage" of two non-sister chromatids in meiotic prophase and reunion of the chromatid ends of the one chromosome with those of the other chromosome. We think that a

conception of chromatid "breakage" does not correspond to the biochemical nature and biophysical state of the chromatids. Colloids do not "break" in the generally accepted sense of the chromatid breakage; only solid bodies "break". On the other hand, the chromatids are not solid and fragile. They have such a physical property in the dead cells. In this respect Belling's (1933) theory of chromatid division and crossing-over following diagonal connections between the chromomeres seems to be more plausible, but if this were the only mechanism that regulates crossing-over, we should have very often found in pure species with totally homologous chromosomes in length, besides the normal chromatids, also such with two centromeres and without centromeres, because no forces were postulated that may act in definite directions and cause definite chromomere junctions and disjunctions. This problem should be more thoroughly investigated and discussed from a biochemical and biophysical point of view.

The appearance of chromosomes with unequal chromatids during the first early anaphase in plant Q as described above underlines once more the fact that we cannot speak of pre- or postreduction (reductional and equational division) of chromosome pairs during the meiosis, because the first division will be reductional only for some segments and equational for the others depending on the place of crossing-over. Hence the terms "heterotypic" and "homeotypic" (homoeotypic) do not express the real process. In connection with this discussion the works by Allen (1926) on *Sphaerocarpus*, Dodge (1931) on *Neurospora*, Goldschmidt and Katsuki (1931) and Goldschmidt (1932) on gynandromorphs and mosaics in silkworm, Huskins and Spier (1934) on speltoids, etc. should be mentioned. The latter authors also observed chromosomes with unequal chromatids but originating following crossing-over between dissimilar (in length) chromosomes.

Correlating our data reported above and those previously recorded (Kostoff 1935a, 1936b) on the formation of new types of chromosomes following crossing-over in structural and undefined hybrids with those reported by Huskins and Spier (1935) on speltoids and by Richardson (1936) on *Lilium* hybrids, the interpretation of the origin of a number of speltoids appears very plausible when hybridisation and crossing-over between chromosomes with dislocated segments is postulated.

The formation of new types of chromosomes in the species hybrids following crossing-over between chromosomes with dislocated segments should be very highly estimated from a phylogenetic point of view. The formation of organisms with new karyotypes represents

realisation of new variants when the constancy (relative, of course) is reached. In estimating such variants from a phylogenetic point of view we should consider not only the possibilities of gene recombinations following recombination of whole linkage groups and crossing-over and chromosome reorganization, but also the effect of the new position of the genes in the chromosomes (position effect), as well as the new mutation rates for the various genes in the new chromosome system (Belgovsky 1934, Kostoff 1935b). The possibility for formation of new types is, one may say, "enormous". A great number of the newly formed gametes, zygotes, and types would not be viable, but a great deal of them give rise to viable forms, which may compete with the old forms in the "struggle for existence".

Some cytologists often search in vain to identify the chromosomes in some allopolyploid forms with the chromosomes of their possible diploid ancestors. In such a kind of work the possible reconstruction of the chromosomes following crossing-over between the chromosomes with dislocated segments in the species hybrids should be considered. An example can be given here with the hybrid *Nicotiana glauca* ($n = 12$) \times *N. Langsdorffii* ($n = 9$) and its amphidiploid forms. The chromosomes of *Nicotiana Langsdorffii* form usually chiasmata with 9 chromosomes of *N. glauca* in the F_1 hybrids. In these hybrids dissimilar chromosomes appeared during the first metaphase (Kostoff 1935c). In the amphidiploid not only bivalents, but also quadrivalents are formed. (Univalents and trivalents also appeared). As a result of allosyndesis in the F_1 as well as in the amphidiploids, and of irregular meiosis, plants are produced in the subsequent generations of the amphidiploids that have different karyotypes. They vary very greatly and the majority of them are fertile (Kostoff 1935d). This amphidiploid plant offers an excellent example on which we can see the mode of origin of great many varieties in a newly formed species. In the progeny of the amphidiploid *N. glauca* \times *N. Langsdorffii* (shortly called *N. Vavilovii*) at least 10 distinct types can be easily found.

Hence we may conclude that the discovery of the ancestor of the tetraploid and hexaploid wheats in studying merely the chromosome morphology would not be a very successful attempt; such kind of studies, however, can show the degree of chromosome differentiation during the phylogenetic development of each *Triticum* species.

Literature

- Allen, C. E. 1926. The direct results of mendelian segregation. Proc. Nat. Acad. Sci. 12: 1-7.
- Avery, P. 1930. Cytological studies of five interspecific hybrids of *Crepis leontodon*-*toides*. Univ. Cal. Pub. Agr. Sci. 6: 135-167.

- Belgovsky, M. L. 1934. The influence of the hybridisation on the mutation frequency of the gene white in *Drosophila simulans*. Compt. Rend. Acad. Sci. of USSR. 4: 108-112.
- Belling, J. 1928. A working hypothesis for segmental interchange between homologous chromosomes in flowering plants. Univ. Cal. Pub. Bot. 14: 383-91.
- 1931. Chiasmata in flowering plants. Univ. Cal. Pub. Bot. 16: 311-33.
- 1933. Crossing-over and gene rearrangement in flowering plants. Genetics, 18: 388-413.
- Creighton, H. B. and McClintock, B. 1931. A correlation of cytological and genetical crossing over in *Zea mays*. Proc. Nat. Acad. Sci. 17: 492-497.
- Darlington, C. D. 1928. Studies in *Prunus*, I and II. Jour. Gen. 19: 213-256.
- 1928. A comparative study of the chromosome complement in *Ribes*. Genetica. Vol. 10 (after Meurman 1928).
- 1932. Recent advances in cytology. J. A. Churchill. London.
- 1935a. The internal mechanics of the chromosomes. I. The nuclear cycle in *Fritillaria*. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 118: 33-69.
- 1935b. The internal mechanics of the chromosomes. II. Prophase pairing in *Fritillaria*. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 118: 59-73.
- 1935c. The internal mechanics of the chromosomes. III. Relational coiling and crossing-over in *Fritillaria*. Proc. Roy. Soc. Ser. B. 118: 74-96.
- 1935d. The time, place, action of crossing-over. Jour. Gen. 31: 185-212.
- Dodge, B. O. 1931. Inheritance of the albinistic non-conidial character in interspecific hybrids in *Neurospora*. Mycologia, 23: 1-50.
- Fujii, K. 1927. Recent progress in cytology and its method of investigation. (Jap.) Proc. Jap. Assoc. Adv. Sci. Vol. 2. (Proc. Kyoto Meet. 1926). After Kuwada and Nakamura (1934).
- 1931. Cytology in the past and present. (Jap.). Iwanami-Koza (Iwanami's Monogr.). After Kuwada and Nakamura (1934).
- Goldschmidt, R. and Katsuki, K. 1931. Vierte Mitteilung über erblichen Ginandromorphismus und somatische Mosaikbildung. Biol. Zentralbl. 51: 58-74.
- Goldschmidt, R. 1932. Pre- oder Postreduktion der Chromosomen? Naturwissenschaften, 20: 358-362.
- Huskins, C. L. and Spier, J. D. 1934. The segregation of heteromorphic homologous chromosomes in pollen-mother-cells of *Triticum vulgare*. Cytologia, 3: 269-277.
- Huskins, C. L. and Hunter, A. W. S. 1935. The effects of X-radiation on chromosomes in the microspores of *Trillium erectum* Linn. Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. 117: 22-33.
- Huskins, C. L. and Smith, S. G. 1935. Meiotic chromosome structure in *Trillium erectum* L. Annals of Bot. 49: 119-150.
- Iwata, J. 1935. Chromosome structure in *Lilium*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imper. Univ. Ser. B. 10: 275-288.
- Janssens, F. A. 1924. La chiasmotypie dans les insectes. Cellule. 34: 135-359.
- Kato, K. and Iwata, J. 1935. Spiral structure of chromosomes in *Lilium*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imper. Univ. Ser. B. 10: 263-273.
- Kaufmann, B. P. 1926. Chromosome structure and its relation to the chromosome cycle. Amer. Jour. Bot. 13: 355-363.
- Kihara, H. 1934. Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. V. Lilienfeld, F. und Kihara, H. *Triticum Timopheevi* Zhuk. Cytologia, 6: 87-122.
- Kostoff, D. 1934. The occurrence of crossing-over in *Nicotiana* species hybrids. Current Sci. 2: 370-373.
- 1935a. Inheritance of natural immunity in plants with special reference to production of immune varieties by hybridisation. Sborn. Ceskoslov. Akad. Zemed. (Ann. of the Czechoslovak Acad. Agric.) 10: 389-402.
- 1935b. On the increase of the mutation frequency following interspecific hybridisation in *Nicotiana*. Current Sci. 7: 302-304.
- 1935c. Conjugation between morphologically different chromosomes in *Nicotiana* species hybrids. Compt. Rend. Acad. Sci. USSR. I (7-8), p. 558-560.

- Kostoff, D. 1935d. Studies on the polyploid plants. X. On the so-called "constancy" of the amphidiploid plants. *Comp. Rend. Acad. Sci. USSR*. I (9), p. 653-657.
- 1936a. Studies on the polyploid plants. XI. Amphidiploid *Triticum Timopheevi* Zhuk. \times *Tr. monococcum* L. *Zeitschr. f. Züchtung. Reihe A. Pflanzenzüchtung*, 21: 41-45.
- 1936b. Studies on poliploid plants. XII. Polyploid forms in *Triticum* experimentally produced. *Bull. de l'Acad. Sci. USSR. Ser. Biol.* 1: 5-22.
- 1936c. Chromosome behaviour in *Triticum* hybrids and allied genera. I. Inter-specific hybrids with *Triticum Timopheevi*. *Bull. of the Instit. of Genet. Acad. Sci. USSR*. 11 (In press).
- 1936d. The genoms of *Triticum Timopheevi* Zhuk., *Secale cereale* L., and *Haynaldia villosa* Schr. *Zeit. ind. Abst. Vererb.* 72: 115-118.
- Kuwada, Y. 1932. The double coiled spiral structure of chromosomes. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 46: 357.
- 1933. Behaviour of chromonemata in mitosis. V. A probable method of formation of the double coiled chromonema spirals and the origin of coiling of the chromonemata into spirals. *Cytologia*, 6: 308-313.
- Kuwada, Y. and Nakamura, T. 1934. Behaviour of chromonemata in mitosis. I. Observation of the pollen mother cells in *Tradescantia reflexa*. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B.* 9: 129-139.
- 1934. Behaviour of chromonemata in mitosis. II. Artificial unraveling of chromonemata. *Cytologia*, 2: 244-247.
- 1934. Behaviour of chromonemata in mitosis. III. Observation of living staminate hair cells in *Tradescantia reflexa*. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B.* 9: 343-366.
- 1934. Behaviour of chromonemata in mitosis. IV. Double refraction of chromonemata in *Tradescantia reflexa*. *Cytologia*, 6: 78-86.
- 1935. Behaviour of chromonemata in mitosis. VI. Metaphasic and anaphasic longitudinal split of chromosomes in the homotype division in pollen mother cells in *Tradescantia reflexa*. *Cytologia*, 6: 314-319.
- Lewitsky, G. A. 1931. The morphology of chromosomes. *Bull. Appl. Bot. Gen. and Plant-Breed.* 27: 19-174.
- Maeda, T. 1928. The spiral structure of chromosomes in the sweet pea (*Lathyrus odoratus*). *Bot. Mag. (Tokyo)*, 42: 191-199.
- Mather, K. 1933a. Interlocking as a demonstration of occurrence of genetical crossing-over during chiasma formation. *Amer. Nat.* 67: 476-479.
- 1933b. The relation between chiasmata and crossing-over in diploid and triploid *Drosophila melanogaster*. *Jour. Genet.* 27: 243-259.
- 1934. The behaviour of meiotic chromosomes after X-irradiation. *Hereditas*, 19: 303-322.
- 1935a. Reductional and equational separation of the chromosomes in bivalents and multivalents. *Journ. Genet.* 30: 53-78.
- 1935b. Meiosis in *Lilium*. *Cytologia*, 6: 354-380.
- Mather, K. and Lamm, R. The negative correlation of chiasma frequencies. *Hereditas*, 20: 65-70.
- Matsuura, H. 1934. On the number of spiral gyres in the chromonemata. *Jap. Jour. Genet.* 9: 143-149.
- 1935a. Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* Pall. I. The number of coils in the chromonema of the normal and abnormal meiotic chromosomes and its relation to the volume of chromosomes. *Cytologia*, 6: 270-280.
- 1935b. Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* Pall. II. The direction of coiling of the chromonema within the first meiotic chromosomes in the PMC. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Series V.* 3: 233-350.
- Meurman, Olavi. 1928. Cytological studies in the genus *Ribes*. *Hereditas*, 11: 288-356.
- Müntzing, Arne. 1934. Chromosome fragmentation in a *Crepis* hybrid. *Hereditas*, 19: 254-302.

- Nebel, B. R. 1932. Chromosome structure in *Tradescantiae*. I and II. Zeits. Zellforsch. mikr. Anat. 16: 251-284, 285-304.
- 1933. Chromosome structure in *Tradescantiae*. V. Optical analysis of a somatic telophase chromosome. Tech. Bull. No. 220. N. Y. State Agric. Exp. Station. p. 3-9.
- Nebel, B. R. and Ruttle, M. N. 1936. Chromosome structure in *Tradescantiae*. VII. Further observation on the direction of coiling in *Tradescantiae*. Amer. Nat. 70: 226-236.
- Richardson, M. Margeret. 1936. Structural hybridity in *Lilium Martagon album* × *Lilium Hansonii*. Jour. Genet. 32: 411-449.
- Satô, D. 1934. Chiasma studies in plants, II. Chromosome pairing and chiasma behaviour in *Yucca*, *Scilla*, and *Urginea*, with special reference to interference. Bot. Mag. (Tokyo), 48: 823-846.
- Satô, D. and Sinotô, Y. Chiasma studies in plants, III. Chromosome pairing and chiasma behaviour in the male *Rumex acetosa* with special reference to the tripartite sex-chromosome. Jap. Jour. Genet. 11: 219-226.
- Sax, Karl. 1936. Chromosome coiling in relation to meiosis and crossing-over. Genetics, 21: 324-338.
- Sharp, L. W. 1934. Introduction to cytology. McGraw-Hill, N. Y.
- Shinke, U. 1934. Spiral structure in chromosomes in meiosis in *Sagittaria Aginashi*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B. 9: 367-392.
- Smith, S. G. 1935. Chromosome fragmentation produced by crossing-over in *Trillium erectum* L. Jour. Genet. 30: 227-232.
- Stern, C. 1931. Zytologisch-genetische Untersuchungen als Beweise für die Morgansche Theorie des Faktorenaustausches. Biol. Zentralbl. 51: 547-587.

Bildung des Kapillitiums bei *Fuligo varians*

Von

G. A. Lewitsky, Leningrad

Die späteren entwicklungsstadien der Fruchtkörperanlage von *Fuligo* ergeben auf Präparaten ein äußerst kompliziertes und buntes Bild. Der auf Fig. 1 und der entsprechenden Photographie 1 (im Text), dargestellte Teil eines „reifen“ Plasmodiums ist typisch und erläutert ziemlich gut die zu diesem Zeitpunkt im Plasma vor sich gehenden Prozesse. Die Kerne befinden sich in den Prophasen derjenigen Teilung, welche dem Zerfallen des Protoplasten in Sporenanlagen unmittelbar vorausgeht (cnf. HARPER 1900). Sie zeichnen sich durch kleine Kernkörperchen und gekörnelte, sich zu einem Spirem anordnende, Chromosomen aus.

Das Plasma ist äußerst verschiedenartig gestaltet: es besteht aus dichteren, dunkleren, an Chondriosomen reicheren Feldern und

von zwischenliegenden helleren an Chondriosomen ärmeren meistens deutlich abgegrenzten Streifen.

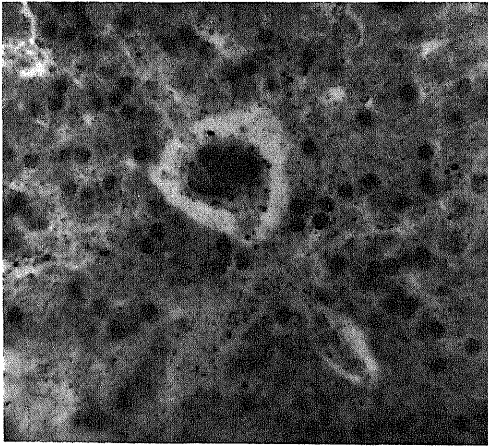


Abb. 1. Photographie entsprechend Taf. 8, Fig. 1.

Die Chondriosomen sind zahlreicher und kleiner als im vorhergehenden Stadium, das auf Abb. 1 meiner früheren Arbeit (LEWITSKY 1924) dargestellt ist, und weisen keine Teilungsfiguren mehr. Das Plasma ist durchfurcht von Vakuolen, die häufig

ausgezogen und durch Anastomosen miteinander verbunden sind, so daß sie stellenweise ein verwickelter Labyrinth bilden. Innerhalb solcher Vakuolen—ein weites Lumen freilassend—sind schleimige Massen von unregelmäßigen Umrissen enthalten, welche längs den Anastomosen der Vakuolen durch gleichfalls schleimige Stränge verbunden sind; diese, wie jene, sind mit zahlreichen, ziemlich großen, bald schwarzen bald in verschiedenen Graden entfärbten, häufig ringförmigen Körnern gewissermaßen umlagert.

In einigen von den größeren solcher, innerhalb der Vakuolen

befindlichen Schleimkörper können, sich intensiver mit Haematoxylin färbende, Massen von degeneriertem Plasma—mit Chondriosomenresten und eingeschrumpften Kernen beobachtet werden, wie dies auf Fig. 1 dargestellt ist.

Die Figuren 2, 3 und 4 in Taf. 8 stellen verschiedene Veränderungsstadien jener Plasmaportionen dar, welche sich abgesondert haben, indem sie sich mit einer Vakuole umgaben.

Fig. 2 ist nach demselben Präparat gemacht wie Fig. 1 und zeigt, daß von Anfang an solche sich abgesondert habende Massen ihre Färbung hartnäckiger beibehalten als das die Vakuole umgebende Plasma; ihre Kerne sind kleiner und ebenfalls dunkel.

Fig. 3 ist nach einem sehr stark differenzierten Präparat gemacht. Abgebildet sind nur die Umrisse der Vakuole und deren Inhalt, welcher aus Plasma von normalem Aussehen mit Chondriosomen und Kern, besteht. Das Plasma ist aber mit einer schleimigen Hülle umgeben, die mit schwach gefärbten Körnern besetzt ist.

Fig. 4 bildet einen Übergang zu Fig. 1 und stellt schon deutlich degeneriertes Plasma dar, welches mit einer umfangreichen schleimigen Hülle umgeben ist; der Kern, obgleich ebenfalls verändert und eingeschrumpft, behält aber seine charakteristischen Merkmale bei.

Verschiedene Stadien der Absonderung von länglichen Plasmastrifen, wobei sich endgültig Vakuolen um dieselben bilden, lassen sich auch auf Fig. 1 (unten) ganz deutlich beobachten; diese ausgeschiedenen Plasmaportionen enthalten hier keine Kerne und sind offenbar bestimmt die schleimigen Stränge, welche die oben beschriebenen größeren kern- und plasmahaltigen Massen miteinander verbinden, zu bilden. Die in diesen Plasmastreifen enthaltenen größeren Körner, welche sich schwächer als die Chondriosomen färben, stammen offenbar von Chondriosomen ab, mit denen sie durch Übergänge verbunden sind. Das Ausscheiden von ähnlichen Körnern aus dem Plasma erfolgt in demselben Stadium auch an der Peripherie des Plasmas, längs den Wänden der einzelnen Sporangien.

Es läßt sich schwerlich bestreiten, daß die obigen Beschreibungen uns ein Bild des anfänglichen Entwicklungsstadiums des für *Fuligo* typischen Kapillitiums vorführen, das aus anastomosierenden und mit Verdickungen versehenen Fäden besteht, wie aus Fig. 5 ersichtlich, die nach einem mit Spiritus fixiertem Stück desselben Äthalliums, doch in einem späteren Stadium, gemacht worden ist. So ist die Bildung des Kapillitiums von *Fuligo* eine von den Erscheinungen in denen sich die für dieses Stadium charakteristische, verstärkte ausscheidende Tätigkeit des Plasmas im reifenden Äthallium offenbart, ein Vorgang, dessen Enwirkung auch ganze Massen von Plasma selbst ergreift.

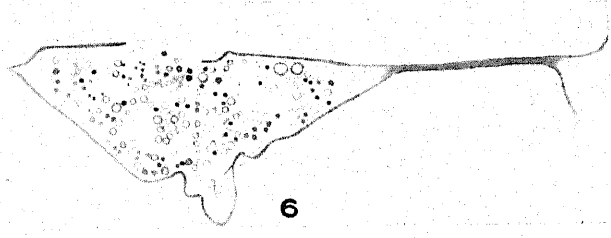
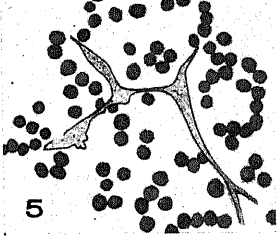
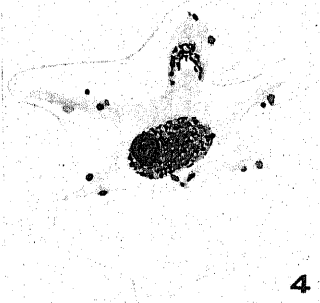
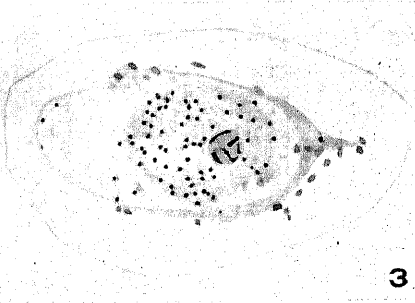
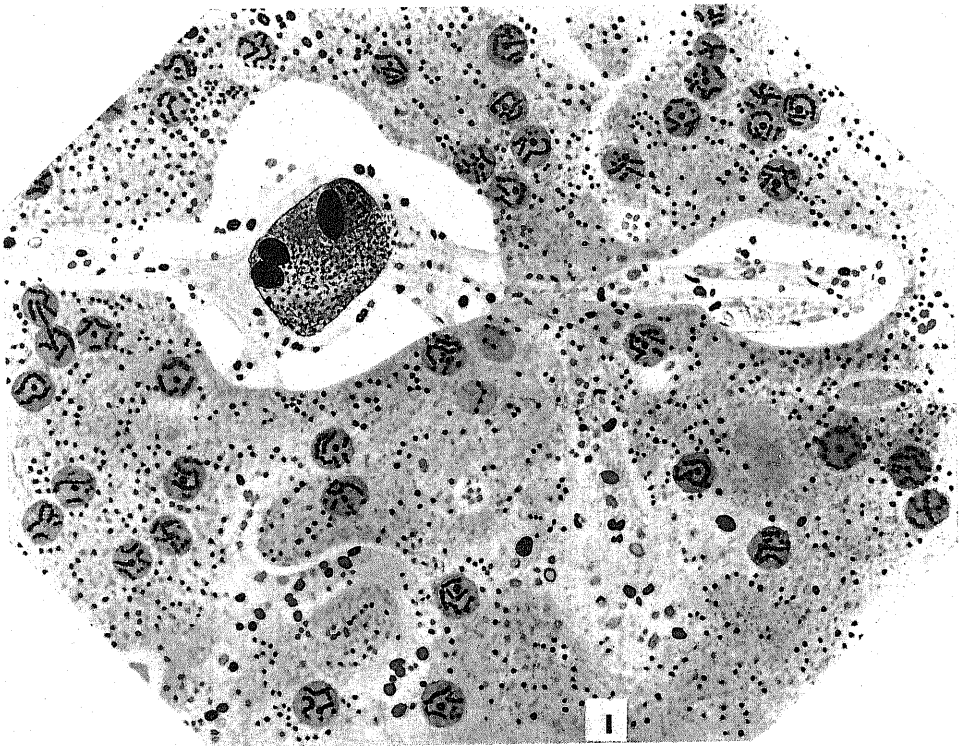
Die soeben beschriebene Bildung des Kapillitiums bei *Fuligo* zeigt, daß das schon längst und allgemein angenommene Entstehen des Kapillitiums der Schleimpilzen als eines Produktes der Ausscheidung oder Umwandlung der plasmatischen Vakuolenhaut—ein hauptsächlich auf den Untersuchungen STRASBURGERS (1884) an *Trichia* begründetes Schema—keine allgemeine Bedeutung hat.¹⁾ Einige weitere Daten in Bezug auf diese Frage habe ich bei der Untersuchung von mit Alkohol behandeltem Material aus demselben Äthallium, doch schon im Stadium junger Sporen und mit vollständig ausgebildeten Kapillitium (Fig. 5) erhalten. Eine von den Verdickungen des letzteren (die linke) ist unter starker Vergrößerung (den Fig. 1–4 entsprechend) auf Fig. 6 dargestellt. Die Differenzierung des Präparats ist mit Absicht sehr schwach, da sonst der ganze Inhalt der Verdickung sich vollständig entfärbt. Wie bekannt, sind bei *Fuligo* die Verdickungen des Kapillitiums, wie auch die Wände der einzelnen Sporangien und die äußere Rinde des Äthalliums, mit kleinen Kalkkörnchen ausgefüllt. Diese Körnchen lösen sich sehr leicht in dem bei Differenzierung angewandten Alaun auf. Deshalb ist nicht zu erwarten solche Körnchen auf unseren Präparaten anzutreffen. Das Innere der Verdickungen ist jedoch nicht leer, sondern, wenn auch nur ziemlich locker, mit zahlreichen Körperchen, meistens in Form von Bläschen, ausgefüllt. Neben den Bläschen kommen auch einzelne, sich ebenfalls schwach färbende solide Körner von geringerem Umfang vor, die offenbar mit den ersteren in genetischem Zusammenhang stehen, wie auch noch kleinere Körner, die sich intensiver färben. Im rechten Winkel ist die Höhlung der Verdickung mit einer lockeren wabigen Masse ausgefüllt, die wie es scheint gleichfalls aus eng zusammengedrängten Bläschen besteht.

Es darf wohl angenommen werden, daß die oben beschriebenen Bläschen den Kalkkörperchen des Kapillitiums von *Fuligo* entsprechen, die folglich in besonderen plasmatischen Granula entstehen

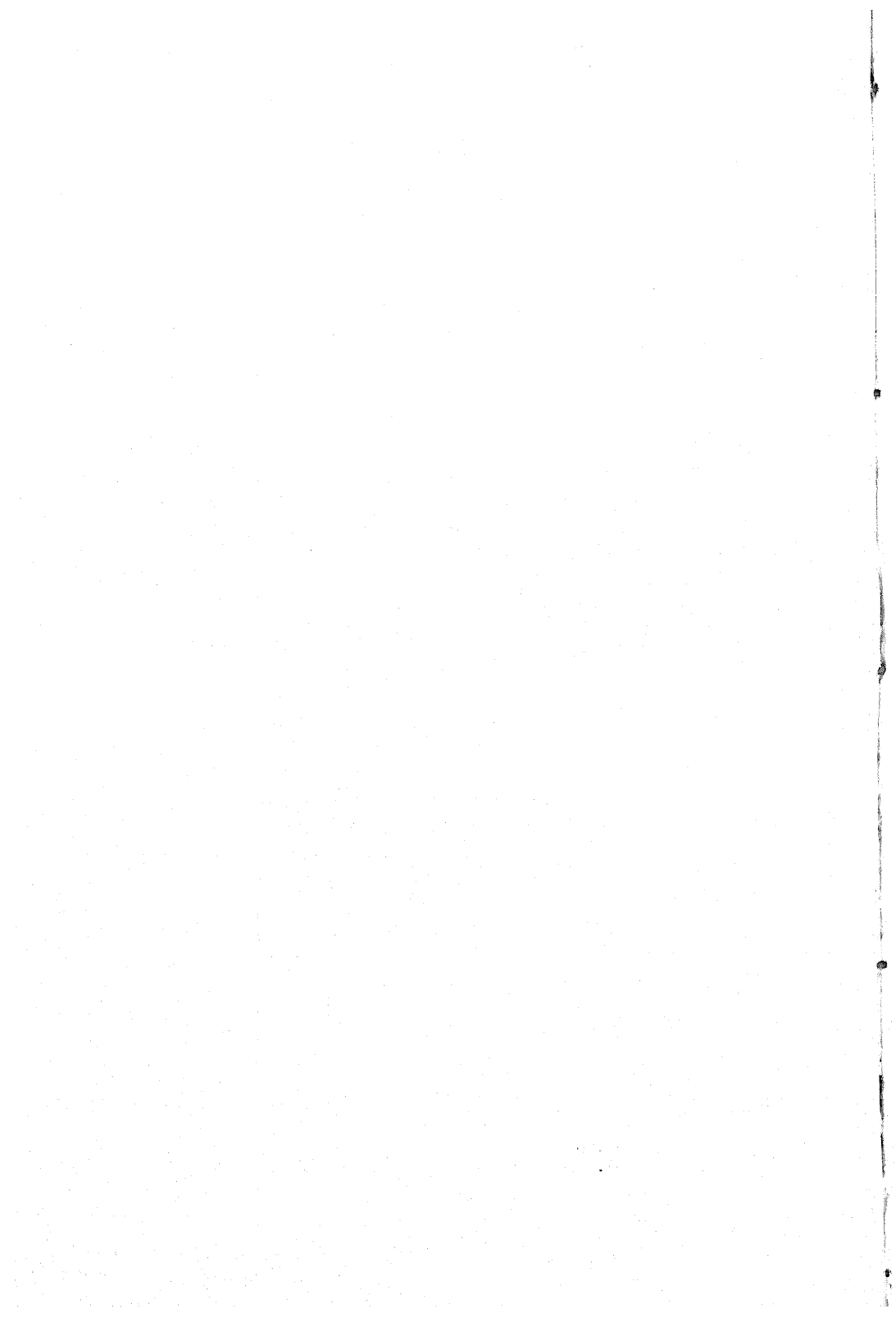
1) ZOPF (1887) ist mit STRASBURGER einverstanden soweit es sich um die Entstehung der hohlen Formen des Kapillitiums (Coelonemata) handelt, besteht aber, was die ausgefüllten (Stereonemata) anbetrifft, auf deren Entstehung aus Plasmasträngen.

HARPER (1900) behauptet „as a matter of fact“, daß „both forms of capillitium may arise in vacuoles, as I have been able to determine in the cases of *Stemonitis* and *Lycogala* (p. 219).“ Bei dem Fehlen von einer genaueren Beschreibung, wie auch von Abbildungen, ist es nicht möglich sich von dem HARPER zur Verfügung stehenden tatsächlichen Material eine rechte Vorstellung zu machen. Letzterer Autor spricht mit keinem Wort über das Kapillitium von *Fuligo* obgleich seine Arbeit sich gerade auf diesen Schleimpilz bezieht, und er die unserem Stadium unmittelbar nachfolgenden Massenteilungen der Kerne und den Beginn der Sporenbildung studiert hat. Zu dieser Zeit sollen doch die Kapillitiumanlagen schon vorhanden sein. In einer späteren Arbeit (HARPER and DODGE 1914) sind die Angaben von STRASBURGER für *Trichia* und *Hemiarcيريا* bestätigt, aber keine Daten über *Fuligo* angegeben. Dasselbe gilt auch für die Arbeit von KRÄNZLIN (1907).

Eins steht fest, daß die Frage hinsichtlich der Bildung des Kapillitiums bei verschiedenen Gruppen von Schleimpilzen noch eine systematische Untersuchung erfordert.



Lewitsky: Bildung des Kapillitiums bei *Fuligo varians*



und deshalb an der Peripherie sich mit der entsprechenden „plastidenartigen“ Hülle bekleiden, in welcher sie dem Anscheine nach ihr Wachstum vollenden.

In einigen Verdickungen lassen sich umfangreiche, sich intensiv färbende Massen von fein-wabiger Struktur beobachten, die bald scharf abgesondert sind, bald allmählich in den übrigen, entfärbten, doch ebenfalls wabigen Inhalt der Verdickung übergehen. Überreste von Kernen habe ich in solchen Massen nicht finden können, doch kann kaum einem Zweifel unterliegen, daß wir es hier mit den letzten Degenerationsstadien derselben plasmatischen Einschlüsse zu tun haben, wie sie auf den vorhergehenden Abbildungen dargestellt sind, umsomehr da genau solche bloß umfangreichere und zahlreiche Kerne enthaltende Überreste von Plasma in den zusammengefallenen Sporangien, welche die Rinde des Äthalliums bilden, inmitten der dem obenbeschriebenen Inhalte der Verdickungen vollkommen ähnlichen feinwabigen entfärbten Masse liegen. Manchmal besteht solch ein Plasma, wie in den Verdickungen des Kapillitiums, so auch in der Rinde des Äthalliums, durchweg aus hohlen (ringförmigen) Körnchen. Die Frage ob alle diese Granula und Bläschen Derivate von Mitochondrien sind habe ich nicht mit Bestimmtheit entscheiden können, und der Zusammenhang zwischen den beiden Arten von Gebilden bleibt daher bloß eine mehr oder weniger wahrscheinliche Mutmaßung.

Literatur

- Harper, R. A. 1900. "Cell and nuclear division in *Fuligo varians*." Bot. Gaz. 30.
 Harper, R. A. and Dodge, B. 1914. "The formation of the capillitium in certain myxomycetes." Ann. of Bot. 28, 1.
 Kränzlin, H. 1907. „Zur Entwicklungsgeschichte der Sporangien bei den Trichien und Arcirien.“ Arch. f. Protistenkunde 9.
 Lewitsky, G. 1924. „Über die Chondriosomen bei den Myxomyceten.“ Zeitschr. f. Bot. 16, 2.
 Strasburger, E. 1884. „Zur Entwicklungsgeschichte der Sporangien von *Trichia fallax*.“ Bot. Ztg. 42.
 Zopf, W. 1887. „Die Pilzthiere oder Schleimpilze.“ (SCHENK's Handb. d. Bot. 3, 1).

Erklärung der Tafel 8

Alle Figuren sind mit Hilfe des ABBESchen Zeichenapparates ausgeführt. Ölimmers. Apochr. v. Leitz 2 mm. Dicke der Schnitte 2,5 μ . Fixation (mit der Ausnahme von Fig. 5 u. 6): 10% Formalin 3 Tage, dann Gemisch von 1% Chromsäure (15 Teile) u. 2% Osmiumsäure (4 Teile) 10 Tage. Fig. 5 und 6 - 96% Alkohol. Färbung - Eisen-hämatoxylin. Vergrößerung (mit der Ausnahme von Fig. 5): 1500.

- Fig. 1. Plasmodium der Fruchtkörperanlage unlängst vor der Sporenbildung. Absonderung der Plasmastreifen für die Ausbildung des Kapillitiums. Kapillitiumanlagen innerhalb der Vakuolen.
 Fig. 2. Abgesonderte Plasmamasse innerhalb der Vakuole.
 Fig. 3. Plasmamasse umgeben mit einer schleimigen Hülle innerhalb der Vakuole.
 Fig. 4. Degeneriertes Plasma umgeben mit einer schleimigen Hülle innerhalb der Vakuole.
 Fig. 5. Kapillitiumabschnitt zwischen den Sporen. Vergr. 200.
 Fig. 6. Eine von den Verdickungen des Kapillitiums von der Fig. 5 (linke) bei einer höheren Vergrößerung.

Cytological Studies in Some Dioecious Plants

By

Goichi Nakajima

Tochigi-ken Normal School, Utsunomiya

Materials and Methods

Materials used in this investigations are as follows:

<i>Populus Sieboldii</i> , Miq.	<i>Clematis heracleaefolia</i> , DC.
<i>Salix Bakko</i> , Kimura	<i>Xanthoxylum piperitum</i> , DC.
<i>S. Caprea</i> , L.	<i>Trichosanthes japonica</i> , Regel.
<i>S. grandulosa</i> , Seem.	<i>T. cucumeroides</i> , Maxim.
<i>S. babylonica</i> , L.	<i>Carex grallatoria</i> , Maxim.
<i>S. integra</i> , Thumb.	<i>Dioscorea gracillima</i> , Miq.
<i>S. sachalinensis</i> , Fr. Schm.	<i>D. Tokoro</i> , Makino
<i>Buchleya Joan</i> , Makino	<i>Smilax hederacea</i> , L.
<i>Humulus lupulus</i> , L.	var. <i>nipponica</i> , Maxim.
var. <i>cordifolius</i> , Maxim.	<i>S. Oldhami</i> , Miq.
<i>Cocculus trilobus</i> , DC.	<i>S. China</i> , L.

Young anthers were taken from plants which were growing in wild and fixed with Carnoy's fluid excepting *Trichosanthes cucumeroides* for which Bouin's solution was used. The root tips were obtained from plants growing in pots with soil and fixed with Navashin's solution. All fixed materials were imbedded in paraffin, cut 12–20 μ thick, and stained with Heidenhain's iron-alum-haematoxylin.

All figures are drawn by the aid of Abbe's large camera using Zeiss apochromatic objective 1.5 mm and Zeiss $\times 15$ compensation ocular. Magnification is $\times 2270$.

Results

Populus Sieboldii, Miq.: According to Blackburn and Harrison (1922, 1924), and Meurman (1925) the reduced chromosome numbers in male plants of *P. tremula*, *P. trichocarpa*, *P. balsamifera*, *P. Simoni*, and *P. tremuloides* are 19. In male plants of *P. Sieboldii*, Miq. I also observed 19 bivalent chromosomes at polar views in the metaphase of the first division (Fig. 1) and the same number of chromosomes were counted in the second metaphase.

The chromosomes varies in size and one of them is particularly large. In side views in 1st metaphase I observed one unequal chromosome pair consisting of two chromosomes of different size and one of them is about twice as large as the other as shown in Fig. 2.

Salix: According to Blackburn and Harrison (1924), Harrison (1926) and Sinotô (1925, 1928, 1929), the reduced chromosome numbers in Genus *Salix* are usually 19, 38 and 57 showing a polyploidy, while the numbers 22 and 44 were also observed by Blackburn and Harrison in some species and ca. 24 by Sinotô (1929) in *S. sachalinensis* forma *Hokkaidô*. These investigators found one unequal pair of chromosomes in the male individuals in each of the above stated polyploid species as well as in *S. sachalinensis* f. *Hokkaidô*.

I have examined the following 6 species of *Salix* i.e., *S. Bakko*, *S. Caprea*, *S. grandulosa*, *S. babylonica*, *S. integra*, and *S. sachalinensis*. The bivalent chromosomes, one of which being especially large, showed variation in size in the male plants of each species except *S. babylonica*, in which I could not count the number of meiotic chromosomes. *S. Bakko*, *S. Caprea*, *S. grandulosa*, *S. integra*, and *S. sachalinensis* have 19 gemini respectively.

I could not detect unequal pairs of chromosomes in polar views of the hetero-typic metaphase in the male plants of these 6 species, but in side views of the same stage one unequal pair of chromosomes was clearly observed as shown in Figs. 4, 6, 7, 9, 11, and 13.

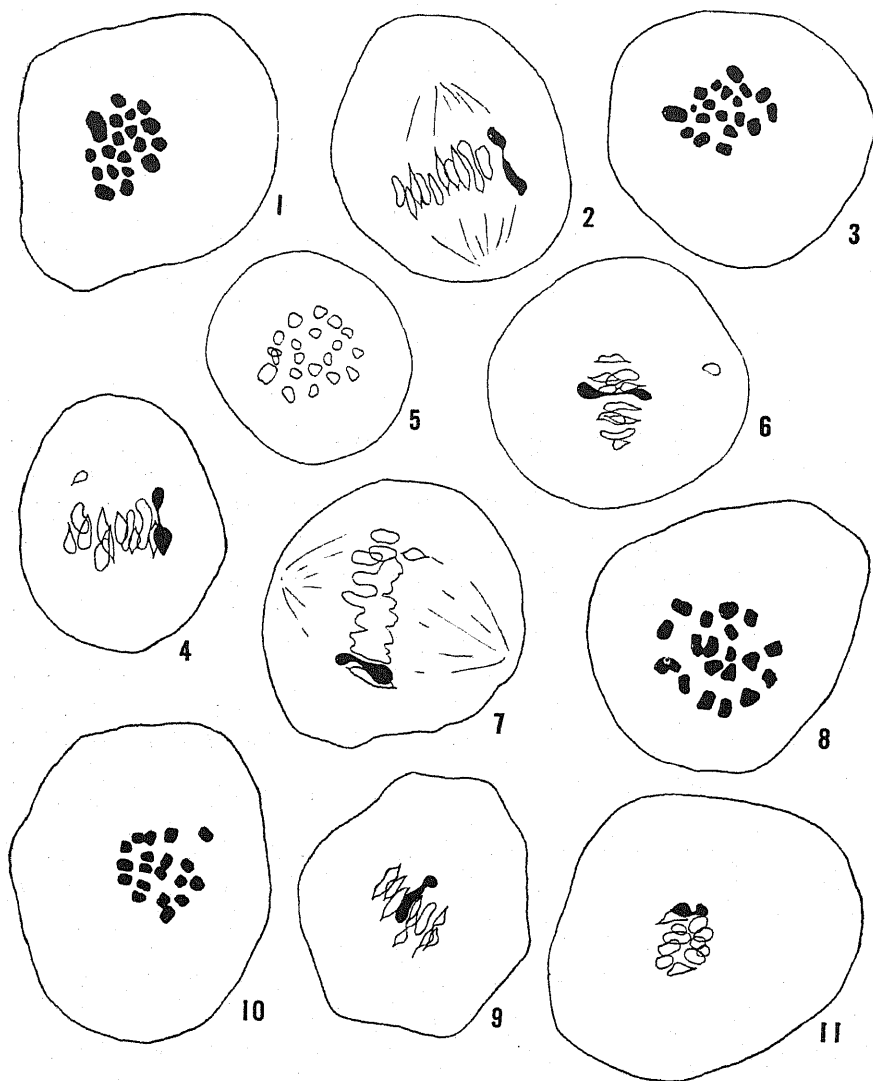
Buchleya Joan, Makino: This plant is well known as a half parasitic shrub in Japan proper. In male plants the reduced number of chromosome was counted as 15 at metaphase in hetero- and homotypic divisions (Fig. 14). One unequal chromosome pair was observed in side views at heterotypic metaphase (Fig. 15). The two members of this pair differing in size disjoined in the heterotypic anaphase and passed to different poles, as shown in Fig. 16 a, b.

Humulus lupulus, L. var. *cordifolius*, Maxim.: The chromosome numbers of *Humulus lupulus* which was reported by Tournois (1914), Winge (1914, 1929), and Sinotô (1929) were $n = 10$ and $2n = 20$.

In this variety I counted 20 chromosomes in root tip cells of the female plants (Fig. 17) and in the tapetum cells of male plants. In the metaphase of hetero- and homotypic divisions in the male plants 10 chromosomes were observed. The same number was reported for *H. lupulus* by the above stated 3 authors.

I could always observed at polar views of the heterotypic metaphase of the male plants of this variety that 8 gemini were located separated from each other, while 2 were connected longitudinally with each other at their ends. This is shown in Fig. 18. In the

homotypic metaphase also, 8 chromosomes out of 10 are separated and the remaining 2 were connected to each other at their ends.



Figs. 1-2. *Populus Sieboldii*. 1, Polar views of heterotypic metaphase, showing 19 gemini. 2, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 3-4. *Salix Bakko*. 3, Polar view of heterotypic metaphase, showing 19 gemini. 4, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 5-6. *S. glandulosa*. 5, Polar view of heterotypic metaphase, showing 19 gemini. 6, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Fig. 7. *S. baby-lonica*. Side view of heterotypic metaphase; unequal pair in black. Figs. 8-9. *S. Caprea*. 8, Polar view of heterotypic metaphase, showing 19 gemini. 9, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 10-11. *S. sachalinensis*. 10, Polar view of heterotypic metaphase, showing 19 gemini. 11. Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black.

I observed in the heterotypic metaphase of the male plants of this variety 8 gemini and one chromosome group consisting of 4 univalent chromosomes connected end to end. The same was reported in *H. lupulus* by Sinotô. In my material the 4 univalent chromosomes vary in their size and in side views of the heterotypic metaphase the group of 4 univalent chromosomes appears as a chain of N shape forming a tetrapartite chromosomes. A typical one is shown in Figs. 19, 21. The two middle members of the tetrapartite are larger than the end ones, and one of the end members is larger than the other. The large end ones are connected with a middle member more loosely than the other three. The same chromosome configuration was reported by Sinotô in *H. lupulus*. The 4 univalent chromosomes of the tetrapartite are named by Sinotô in *H. lupulus* as $X_1Y_1X_2Y_2$ in an order of their connection beginning with the large end chromosome to the smaller end one.

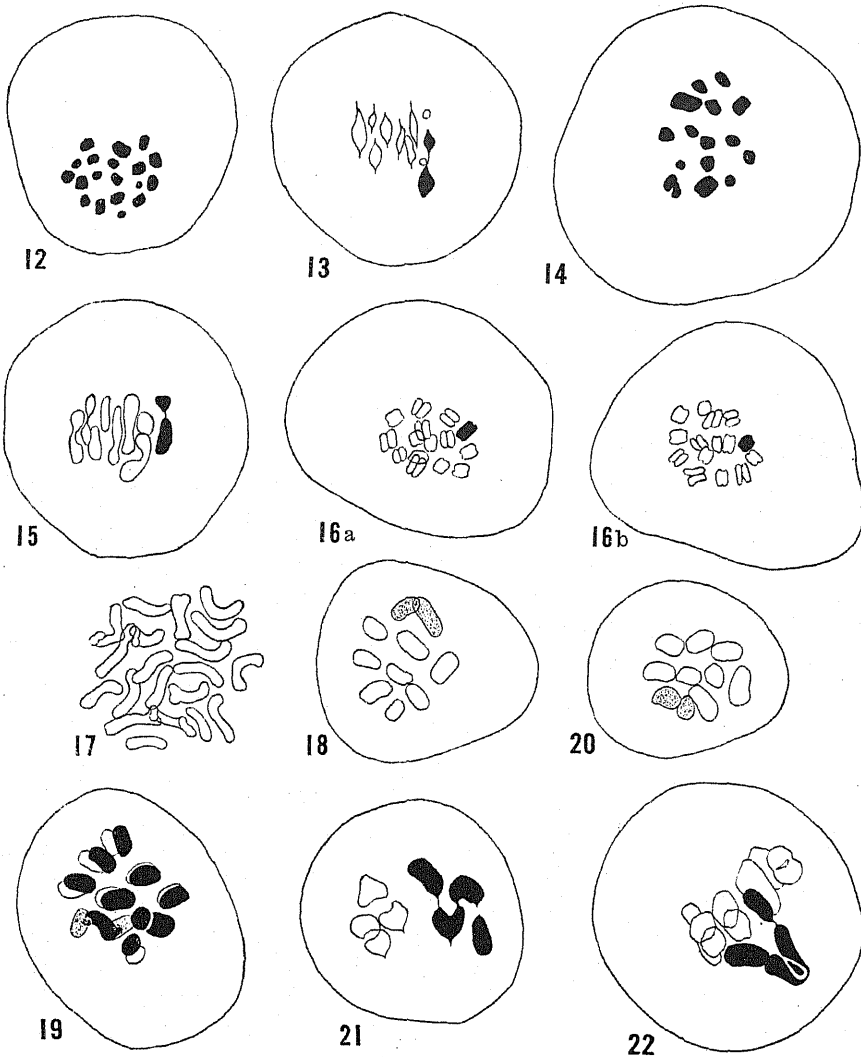
In my material in heterotypic anaphase X_1 and X_2 are separated from Y_1 and Y_2 and go to one pole together with the other 8 autosomes as the same in the cases of *H. lupulus* reported by Sinotô. The X_1X_2 and Y_1Y_2 chromosomes of the homotypic metaphase could be distinguished in their polar views from the autosomes (Fig. 20). In the heterotypic anaphase the tetrapartite chromosome occasionally goes toward a pole. The same behaviour of the tetrapartite was reported in *H. lupulus* by Sinotô. In such cases one of the daughter nuclei must contain all the chromosomes of the tetrapartite group. The cases in which the 4 elements are connected in the form of

$$\begin{array}{c} X_1 \quad Y_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ Y_1 \quad X_2 \end{array} \quad \text{or} \quad \begin{array}{c} X_1 \quad Y_1 \\ \diagdown \quad \diagup \\ Y_2 \quad X_2 \end{array}$$

were also observed rarely. In such cases the allosomes may be separated in the heterotypic anaphase into two groups X_1Y_2 and X_2Y_1 or X_1Y_1 and X_2Y_2 , and each of these groups may go to opposite poles together with the 8 autosomes (Fig. 22).

Cocculus trilobus, DC.: The reduced chromosome number of the male plants was found to be 25 at polar views in the heterotypic metaphase (Fig. 23). One unequal pair of chromosomes was observed in side views of the heterotypic metaphase. One of its two members is about twice as large as the other as shown in Fig. 24 in black. In some cells two or more laggards were observed.

Clematis heracleaefolia, DC.: The writer (1933) found that the somatic number is 16 in the male plants of this species. In the present study 8 was determined as the reduced number at heterotypic metaphase in P.M.C's of the male plants (Fig. 25). But I could not observe unequal pair of chromosomes. A tetrad was observed which is consisted of 4 cells of various sizes.



Figs. 12-13. *S. integra*. 12, Polar view of heterotypic metaphase, showing 19 gemini. 13, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 14-16. *Buckleya Joan*. 14, Polar view of heterotypic metaphase, showing 15 gemini. 15, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. 16a, b, Two chromosome groups in heterotypic anaphase; the two members of the unequal pair in black. Fig. 17. Somatic plate of female individuals of *Humulus lupulus* var. *cordifolius*. Figs. 18-22. *Humulus lupulus* var. *cordifolius*. 18, Polar view of heterotypic metaphase, showing 2 connection of X and Y gemini. 19, Polar view of meta-anaphase, showing one tetrapartite chromosome and 8 gemini. 20, Polar view of homotypic metaphase; dotted chromosomes are X and Y. 21, Side view of heterotypic meta-anaphase; tetrapartite chromosome in black. 22, Abnormal behaviour of the tetrapartite chromosome in heterotypic division.

Xanthoxylum piperitum, DC.: Sinotô (1929) reported in the male plants of this species that the reduced number is 35 and one of them was especially large and seemed to be univalent.

I counted also 35 chromosomes in polar views of the heterotypic metaphase of the male plant in the same species (Fig. 26). In side views in the same stage I observed one unequal pair of chromosomes (Fig. 27) and one univalent (Fig. 28). The univalent chromosome in Sinotô's material was large. On the contrary however it was small in my material. This occasionally reached the pole earlier than the others (Fig. 29). One or more laggards were observed and one or two chromosomes passed to the pole earlier than the others.

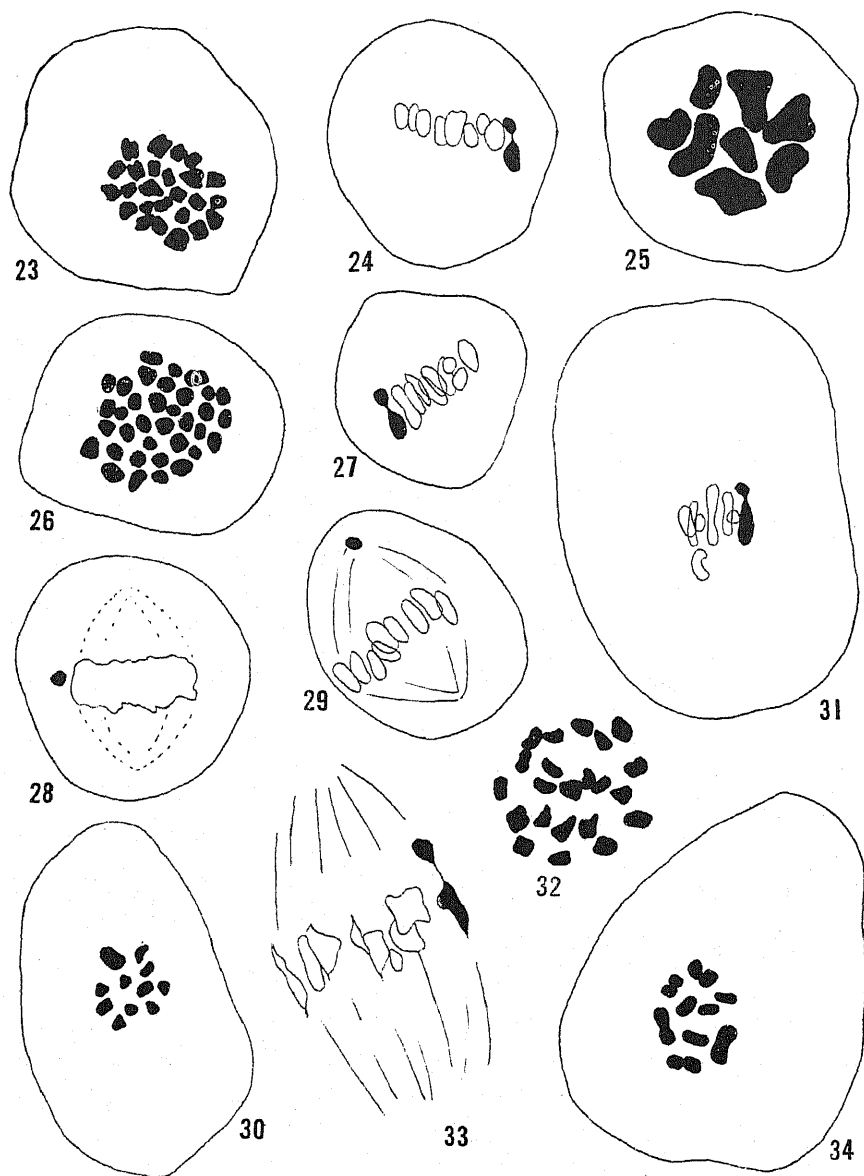
Trichosanthes japonica, Regel., *T. cucumeroides*, Maxim.: According to Sinotô (1928) and Sugimoto (1928) *Trichosanthes* presents, a polyploidy, the basic number being 11. The chromosome number of *T. japonica* and *T. cucumeroides* were reported by Sinotô (1928) and Sugimoto (1928) to be $n = 11$, $2n = 22$ and $n = 22$, $2n = 44$ respectively.

The present writer also counted in the male plants 11 chromosomes of similar size in the heterotypic metaphase in *T. japonica* (Fig. 30) and 22 in the homotypic metaphase in *T. cucumeroides* (Fig. 32).

The observation in side views of the heterotypic metaphase showed the existence of one unequal pair of chromosomes in each species as shown in Figs. 31, 33.

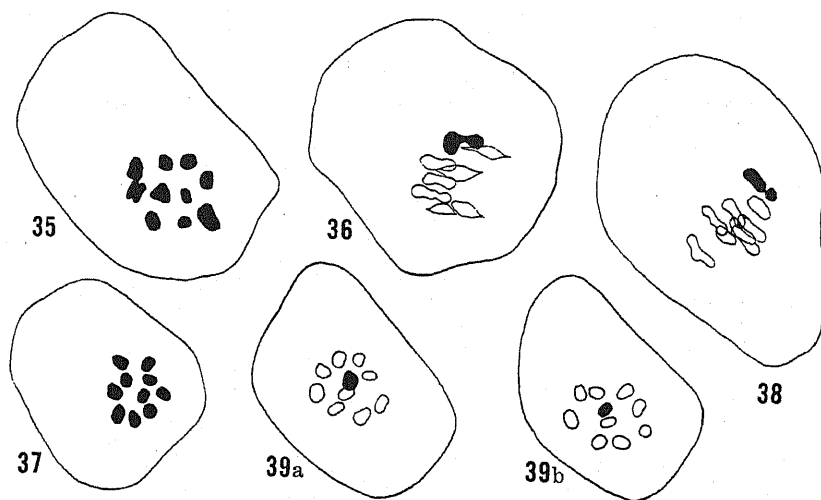
Carex grallatoria, Maxim.: The reduced chromosome number was decided to be 9 in polar views of the heterotypic metaphase of the male plants (Fig. 34). The chromosomes vary in their size. One of them is especially larger than the others. I could not find any unequal pair in both polar and side views of the heterotypic division.

Dioscorea gracillima, Miq., *D. Tokoro*, Makino: According to Meurman (1925) the reduced numbers of chromosomes are 17 and 18 in *Dioscorea sinuata* and 10 in *D. caucasca*. In *D. sinuata* the type of sex chromosome was XO, while in *D. caucasca* the sex chromosomes were not observed. The somatic number of the male plants in these two species, *D. gracillima* and *D. Tokoro*, were reported by the present writer (1933) to be 20 in each. The reduced number in *D. gracillima* and *D. Tokoro* are 10 in each, corresponding to half that of their somatic ones (Figs. 35, 37). The gemini of *D. gracillima* varies in size, but those of *D. Tokoro* are of similar size. An unequal pair of chromosomes was observed in side views of the heterotypic metaphase in these two species (Figs. 36, 38). In the heterotypic anaphase of *D. Tokoro* the two members of the unequal pair were



Figs. 23-24. *Cocculus trilobus*. 23, Polar view of heterotypic metaphase, showing 25 gemini. 24, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Fig. 25. *Clematis heracleaeifolia*. Polar view of heterotypic metaphase, showing 8 gemini. Figs. 26-29. *Xanthoxylum piperitum*. 26, Polar view of heterotypic metaphase, showing 35 gemini. 27, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. 28-29, Side views of the same stage, showing univalents in black. Figs. 30-31. *Trichosanthes japonica*. 30, Polar view of heterotypic metaphase, showing 11 gemini. 31, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 32-33. *Trichosanthes cucumeroides*. 32, Polar view of homotypic metaphase, showing 22 chromosomes. 33, Side view of heterotypic metaphase, unequal pair of chromosomes in black. Fig. 34. *Carex grallatoria*. Polar view of heterotypic metaphase, showing 9 gemini.

clearly observed to disjoin from each other and they passed to the opposite poles as shown in Fig. 39 a, b.

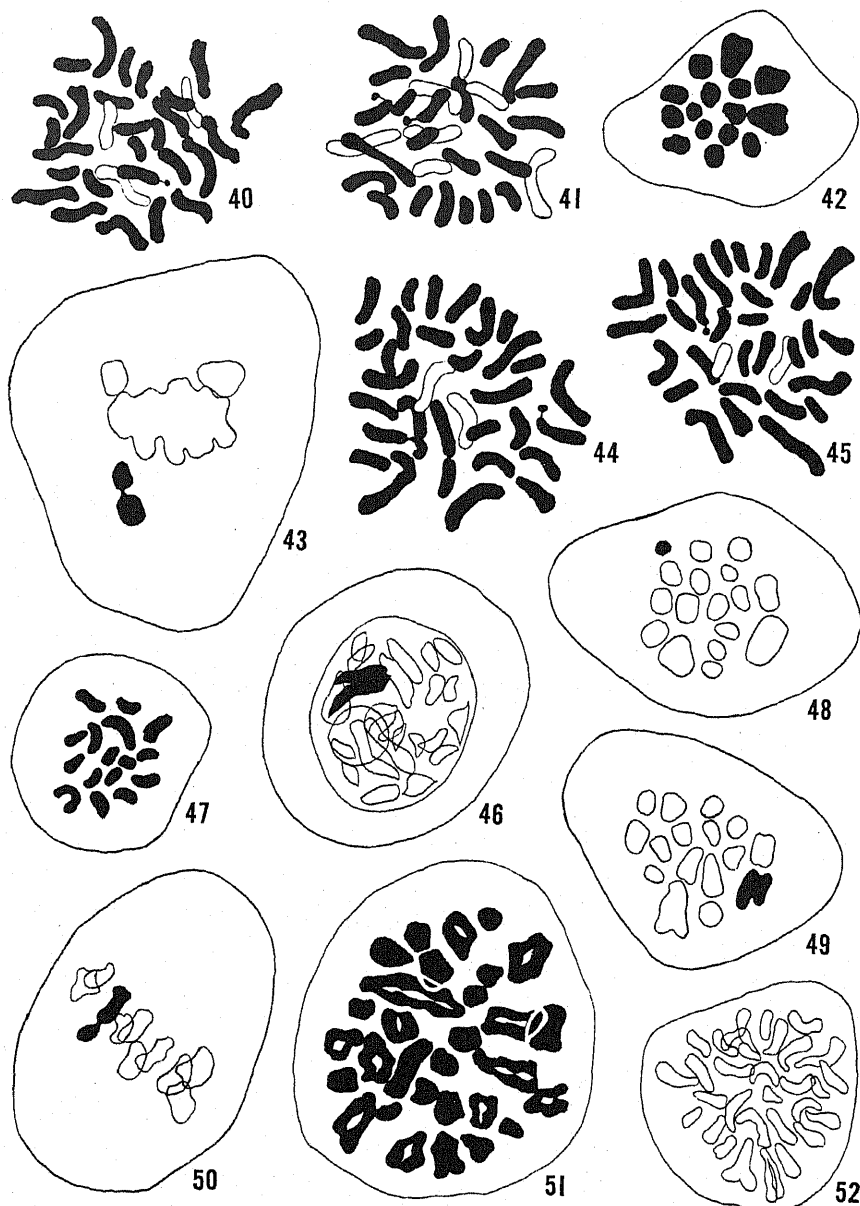


Figs. 35-36. *Dioscorea gracillima*. 35, Polar view of heterotypic metaphase, showing 10 gemini. 36, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 37-39. *D. Tokoro*. 37, Polar view of heterotypic metaphase, showing 10 gemini. 38, Side view of the same stage; unequal pair in black. 39 a, b, 2 daughter nuclear plates in homotypic metaphase, showing the members of an unequal pair in black.

Smilax hederacea, L. var. *nipponica*, Maxim., *S. Oldhami*, Miq., *S. China*, L.: Cytological studies in *Smilax herbacea* were made by Humphrey (1914), Elkins (1914), and Lindsay (1929, 1930). According to the first two investigators the reduced number of the male plants was 12, while Lindsay reported 13. But the existence of sex-chromosomes was not recognized by them.

The present writer observed 30 rod shaped or curved somatic chromosomes of varying size in both male and female plants of *S. hederacea*, var. *nipponica* and one or two of them showed a satellite (Figs. 40, 41). The reduced number 15 of the male plants were counted in the polar view of the heterotypic metaphase (Fig. 42). In the side view an unequal pair of chromosomes was found (Fig. 43). In the heterotypic metaphase, one or two chromosomes passed to the poles earlier than the others.

In *Smilax Oldhami*, Miq. the somatic number 32 was counted in each of the 10 male and 2 female individuals. They were rod shaped or curved and their size varied (Figs. 44, 45). At diakinesis of P.M.C's one bivalent consisting of a large and a small members was observed (Fig. 46). In polar views of hetero- and homotypic metaphases 16 gemini of varying size were observed, one of which being



Figs. 40-43. *Smilax hederacea*, var. *nipponica*. 40, Male plant, showing 30 somatic chromosomes. 41, Female plant, showing 30 somatic chromosomes. 42, Polar view of heterotypic metaphase, showing 15 gemini. 43, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 44-50. *Smilax Oldhami*. 44, Male plants, showing 32 somatic chromosomes. 45, Female plants showing 32 somatic chromosomes. 46, Diakinesis, unequal pair in black. 47, Polar view of homotypic metaphase, showing 16 chromosomes. 48, Polar view of heterotypic metaphase, showing 16 gemini and a univalent chromosome in black. 49, Polar view of heterotypic metaphase, showing 16 gemini unequal pair in black. 50, Side view of the same stage; unequal pair of chromosomes in black. Figs. 51-52. *S. China*. 51, Polar view of heterotypic metaphase, showing 30 gemini. 52, Polar view of homotypic metaphase, showing 30 chromosomes.

especially large (Fig. 47). In the same stage a cell showing 16 chromosomes together with one small spheroid shaped chromosome which seems to be a univalent or a chromosome fragment was observed (black in Fig. 48). But the spheroid shaped chromosome could not be observed in somatic plates. In the heterotypic anaphase the univalent chromosome goes to the pole earlier or later than the others. In both polar and side views of the heterotypic metaphase I observed an unequal pair of chromosomes consisting of a large and a small members (black in Figs. 49, 50). In the heterotypic anaphase up to 4 laggards were observed.

In *Smilax China*, L. 30 chromosomes of varying size were observed in polar views of the hetero- and homotypic metaphases in the male plants (Figs. 51, 52). In side views of the heterotypic metaphase a heteromorphic pair was found the members of which differing in their size, were disjoining and passing to the poles earlier than the others.

In the heterotypic anaphase an unequal pair consisting of two large and small elements was observed and up to 3 laggards were observed there.

Summary

1) The male individuals of the dioecious plants comprising 11 genera, 18 species and 2 varieties have been investigated cytologically, with special reference to the sex chromosomes.

2) In each of 16 species and one variety one unequal pair of chromosomes was observed. This unequal pair is assumed to be a sex chromosome complex of XY type.

3) A tetrapartite chromosome was observed in *Humulus lupulus* var. *cordifolius*, which may be a sex chromosome complex of YYYY type.

4) In *Carex grallatoria* and *Clematis heracleaefolia* any morphological sex chromosome complex was not observed.

In closing the writer wishes to express his thanks to Prof. Kagawa of the Utsunomiya Agricultural College for his valuable suggestion in this work.

Literature Cited

- Blackburn, K. B. (1926). On the occurrence of sex chromosomes in flowering plants with some suggestions as to their origin. Proc. of the Internat. Congr. of Plant Sci. 1.
- and Harrison, J. W. H. (1922). The meiotic phase in the Salicaceae. Rept. Brit. Ass. for the Adv. Sci., p. 398. cited from Blackburn (1929).
- and — (1924). A preliminary account of the chromosomes and chromosome behaviour in the Salicaceae. Ann. Botany 38.
- Elkins, M. G. (1914). The maturation phase in *Smilax herbacea*. Bot. Gaz. 57. cited from Lindsay (1930).

- Harrison, J. W. H. (1926a). Heterochromosomes and polyploidy. *Nature* 117. cited from Blackburn (1929).
- (1929b). Polyploidy and sex chromosomes. *Ib.* 117. cited from Blackburn (1929).
- Humphrey, L. E. (1914). A cytological study of the stamens of *Smilax herbacea*. *Ohio Nat.* 15. cited from Sinotô (1929).
- Lindsay, R. H. (1930). The chromosomes of some dioecious angiosperms. *Amer. Journ. Bot.* 17.
- Meurman, O. (1925). The chromosome behaviour of some dioecious plants and their relatives with special reference to the sex chromosomes. *Soc. Sci. Fenn. Comm., Biol.* 2.
- Nakajima, G. (1933). Chromosome numbers in some angiosperms. *Jap. Journ. Genet.* 9.
- Sinotô, Y. (1929). Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. *Cytologia* 1.
- Sugimoto, T. (1928). On the chromosome number in Cucurbitaceae. *Rigakukai* 26.
- Tournois, J. (1914). Etudes sur la sexualité an haublon. *Ann. Sci. Nat.* 19. cited from Sinotô (1929).
- Wettstein, F. v. (1927). Die Erscheinung der Heteroploidie, besonders im Pflanzenreich. *Erg. d. Biolog.* 2. cited from Sinotô (1929).
- Winge, Ö. (1914). The pollination and fertilization process in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Sieb. et Zucc. *C. R. Lab. Carlsberg* 11. cited from Winge (1929).
- (1929). On the nature of the sex chromosomes in *Humulus*. *Hereditas* 12.
-

Zwei unerwartete 36-chromosomige Pflanzen in der Rückkreuzung

T. polonicum \times (*T. polonicum* \times *T. spelta*)¹⁾

Von

Seiji Matsumura

Einleitung

In den Gonen der pentaploiden F_1 -Bastarde zwischen den Weizen der Emmer- und der Dinkelreihe sind die Chromosomenzahlen von 14 bis 21 möglich. Die Rückkreuzungen $F_1 \times$ Dinkel bzw. $F_1 \times$ Emmer ergeben 35- bis 42- bzw. 28- bis 35-chromosomige Pflanzen. Hier und da treten aber Individuen mit unerwarteten Chromosomenzahlen auf. KIHARA und WAKAKUWA (1935) haben in den Rückkreuzungen des Bastards *T. polonicum* \times *T. spelta* mit *T. spelta* und *T. polonicum* drei Pflanzen mit unerwarteten Chromosomenzahlen gefunden, nämlich bei $F_1 \times T. spelta$ eine mit 32, und bei $F_1 \times T. polonicum$ zwei mit 38 bzw. 48 Chromosomen. Im Jahre 1935 habe auch ich eine aberrierende, und zwar 44-chromosomige Pflanze bei *T. spelta* \times F_1 und zwei 36-chromosomige bei *T. polonicum* \times F_1 beobachtet (MATSUMURA, 1936 b und c). Die Reifungsteilungen bei den 36-chromosomigen Individuen und die Chromosomenzahlen in ihrer Nachkommenschaft sollen im folgenden beschrieben werden.

Diese Untersuchung wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. KIHARA ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, ihm auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Material und Methoden

Der für diese Untersuchung benutzte Dinkel war *Triticum spelta* var. *Duhamelianum* KÖRN.; *T. polonicum* var. *vestitum* KÖRN. war das Emmerelter. Von 149 Pflanzen der Rückkreuzung *T. polonicum* \times F_1 hatten zwei Individuen unerwartete Chromosomenzahlen, nämlich $2n = 36$.

Fixierung und Färbung wurden in der schon oft beschriebenen Weise ausgeführt (z.B. MATSUMURA, 1936a).

Ergebnisse

Abb. 1 und 2 bringen die somatischen Chromosomen (aus Wurzelspitzen) der beiden Aberranten (Nr. 28 und 85). Die Ähren dieser Pflanzen sind in Abb. 3a und 3b zu sehen.

1) Contributions from the Laboratory of Genetics, Biological Institute, Department of Agriculture, Kyoto Imperial University. No. 81.

In der I. Metaphase traten bei Nr. 85 meist 15 Gemini und 6 Univalente auf (Abb. 9 und 10). Diese Pflanze gehört demnach zu den fertilen Chromosomenkombinationen (vgl. KIHARA, 1924). Vereinzelt wurden die Konfigurationen $1_{III} + 14_{II} + 5_I$ und $14_{II} + 8_I$ festgestellt (Abb. 11 und 12). Die Trivalenten waren V-förmig. Bei Nr. 28 wurden die Konfigurationen $14_{II} + 8_I$ (Abb. 4 und 5) und $1_{III} + 13_{II} + 7_I$ (Abb. 6) beobachtet. Die erstere war beträchtlich häufiger als die letztere. Tabelle 1 zeigt die Häufigkeit der Anordnungsweisen der Chromosomen bei beiden Pflan-

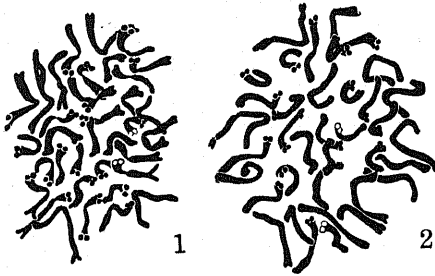


Abb. 1-2. Somatische Kernplatten mit 36 Chromosomen aus Wurzelspitzen. Vergr. ca. 1500.
1. Nr. 28. 2. Nr. 85.



Abb. 3. Ähren der Pflanzen Nr. 28 (a) und 85 (b).

zen. Bei Nr. 28 waren die Trivalenten auch meist V-förmig, doch trat hier, wenngleich selten, auch die Y-förmige Anordnung auf. Es waren nämlich von 16 Trivalenten 12 V- (Abb. 6), 3 Y-förmig (Abb. 7) und 1 war geradlinig (Abb. 8).

Tabelle 1. Häufigkeit der verschiedenen Kombinationsweisen der meiotischen Chromosomen in den Pollenmutterzellen von zwei Pflanzen mit unerwarteten Chromosomenzahlen

Nr. der Pflanze	Kombinationsweise				Summe
	$1_{III} + 13_{II} + 7_I$	$14_{II} + 8_I$	$15_{II} + 6_I$	$1_{III} + 14_{II} + 5_I$	
Nr. 28	16	34	—	—	50
Nr. 85	—	1	46	3	50

Tabelle 2 orientiert über den Körneransatz an isolierten Ähren dieser beiden Pflanzen und die Keimung. Nr. 85 ist deutlich höher fertil als Nr. 28, aber mit der Keimungsfähigkeit verhält es sich



Abb. 4-12. I. Metaphase in Pollenmutterzellen der Pflanzen Nr. 28 (Abb. 4 8) und 85 (9-12). Die Trivalenten und Univalenten sind in sämtlichen Abbildungen schwarz. Vergr. ca. 1650. 4. Polansicht mit $14_{II}+8_I$. 5. Seitenansicht mit $14_{II}+8_I$. 6-8. $1_{III}+13_{II}+7_I$. 9. Polansicht mit $15_{II}+6_I$. 10. Seitenansicht mit $15_{II}+6_I$. 11. $1_{III}+14_{II}+5_I$. 12. $14_{II}+8_I$.

Tabelle 2. Fertilität der Pflanzen Nr. 28 und 85 und Keimungsfähigkeit ihrer Körner

Nr. der Pflanze	Zahl d. Ähren	Zahl d. 1-2 Bl.	Zahl d. Körner (%)	aus- gesät	gekeimt (%)	von d. Keiml. eingegan- gen (%)	ge- schoßt
Nr. 28	2	84	25 (29.76)	29	21 (72.41)	5 (23.81)	16
Nr. 85	3	156	65 (41.66)	57	30 (52.63)	4 (13.33)	26

umgekehrt. Die Lebensfähigkeit der Keimlinge wiederum war merklich geringer bei Nr. 28; vor dem Schossen gingen 5 Pflanzen

(23.81%) ein und von den überlebenden waren viele zwergig. Bei den am Leben gebliebenen Individuen wurden die Chromosomenzahlen in den Wurzelspitzen festgestellt, wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist.

Tabelle 3. Häufigkeit der verschiedenchromosomigen Pflanzen in der Nachkommenschaft der Pflanzen Nr. 28 und 85

Nr. der Pflanze	Chromosomenzahlen														Summe
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
Nr. 28	2	1	1+1 ¹⁾	1	2+1 ²⁾	—	—	—	2+1 ³⁾	1	1	—	—	—	14
Nr. 85	2	1	2	1	3	2	1	3	1	2	2	2	2	2	26

1) $2n = 31$ + kleines Chromosomenfragment.

2) „ 33 + großes.

3) „ 37 + „

In der Nachkommenschaft von Nr. 28 weist die minderchromosomige Gruppe mit 29–33 Chromosomen bedeutend mehr Vertreter auf als die höherchromosomige. Drei Pflanzen hatten ein Chromosomenfragment, nämlich eine 31 Chromosomen + 1 kleines Fragment und zwei 33 bzw. 37 Chromosomen + je 1 größeres Fragment. Bei Nr. 85 war aber die (36–42)-chromosomige Gruppe etwas individuenreicher als die (29–34)-chromosomige. Nr. 85 mit $15_{II} + 6_I$ gehört zur Vermehrungsgruppe und in der Nachkommenschaft waren die Chromosomenzahlen von 30 (15_{II}) bis 42 (21_{II}) möglich. In Wirklichkeit wurden unerwartet zwei 29-chromosomige Pflanzen beobachtet. Dies dürfte darauf beruhen, daß 14-chromosomige durch Chromosomenelimination entstandene Gonen durch 15-chromosomige Pollen befruchtet wurden.

Diskussion

Das Auftreten von 36-chromosomigen Pflanzen in der Verbindung *T. polonicum* \times F_1 könnte man so deuten, daß 14-chromosomige Eizellen von *T. polonicum* durch 22-chromosomige Spermakerne des Bastards befruchtet wurden. Das überzählige Chromosom kann sich im Gefolge von non-disjunction ergeben haben. Da die Pflanze Nr. 85 in der Regel die Chromosomenkombination $15_{II} + 6_I$ hatte, muß sie außer 14 Bivalenten aus den Genompaaren AA und BB ein Paar und 6 Univalente des D-Genoms besessen haben. Demnach gehört das überschüssige Chromosom zum D-Genom. Man konnte aber bei ihr außerdem eine geringe Anzahl abweichender Chromosomenkombinationen finden, und zwar $1_{III} + 14_{II} + 5_I$ sowie vereinzelt $14_{II} + 8_I$. Im ersten Falle dürfte das Tripartite aus einem der B-Paare und dem mit diesem partiell homologen Chromosom des D-Genoms entstehen (vgl. KIHARA und NISHIYAMA, 1930 a und b). Im letzteren Falle muß man annehmen, daß die homologen Chromosomen des D-Paares

ungepaart bleiben bzw. sich vor der Metaphase getrennt haben. KIHARA und NISHIYAMA (1930 a und b) haben bei den pentaploiden Bastarden mit der Chromosomenkombination $14_{II} + 7_I$ manchmal ähnliche Abweichungen beobachtet, wie z.B. $1_{III} + 13_{II} + 6_I$ und $13_{II} + 9_I$.

Bei der anderen Pflanze, Nr. 28, wurden die Bindungsweisen $14_{II} + 8_I$ und $1_{III} + 13_{II} + 7_I$ gefunden. In diesem Falle ist anzunehmen, daß das überschüssige Chromosom zu einem der Genome A oder B gehört. Die dreigliedrigen Verbände dürften in diesem Falle aus 3 homologen Chromosomen des A- oder B-Genoms bestehen und echte Trivalente sein.

Nach KIHARA (1924) vermehrt sich die Chromosomenzahl in der Vermehrungsgruppe im Laufe der Generationen stetig, aber langsam, bis sie die konstante Zahl 42 erreicht, während die Rückkehr zum 28-chromosomigen Eltertyp in der Verminderungsgruppe immer plötzlich vor sich geht. MORIYA (1932), der die Bestimmung der Chromosomenzahlen in der Nachkommenschaft eines Individuums mit $14_{II} + 6_I$ ausgeführt hat (vgl. KIHARA, 1932), konnte das Gleiche beobachten. Auch meine Untersuchung der Pflanze aus der Vermehrungsgruppe mit $15_{II} + 6_I$ bestätigt die Ansicht von KIHARA.

In der Nachkommenschaft des Individuums mit $15_{II} + 6_I$ wurden zwei Pflanzen mit unerwarteten Chromosomenzahlen, nämlich 29 Chromosomen, gefunden. Die 29-chromosomigen Pflanzen dürften durch Verschmelzung von 15- mit 14-chromosomigen Gameten entstanden sein, in denen ein Chromosom eliminiert worden ist. Ähnliche Pflanzen mit unerwarteten Chromosomenzahlen in der Nachkommenschaft der pentaploiden Weizenbastarde wurden von JENKINS und THOMPSON (1930) und STEVENSON (1930) gefunden. JENKINS und THOMPSON berichten über eine Pflanze mit $16_{II} + 5_I$ in der Nachkommenschaft eines Individuums mit $18_{II} + 3_I$ und eine andere mit $18_{II} + 3_I$ in der Nachkommenschaft einer Pflanze mit $19_{II} + 2_I$. Sie dürften dadurch entstanden sein, daß einige Chromosomenpaare bei den Eltern ungepaart geblieben bzw. vor der I. Metaphase auseinandergegangen sind. Auch STEVENSON beobachtete in F_3 die Chromosomenkombinationen $15_{II} + 3_I$, $15_{II} + 4_I$, $16_{II} + 4_I$, $17_{II} + 4_I$ und 21_{II} in der Nachkommenschaft einer F_2 -Pflanze mit $17_{II} + 4_I$. Er sagt: „The F_2 plant No. 567-6 had approximately 38 chromosomes. From two to six univalents were observed in side views of the metaphase of the first division.“ Daraus kann geschlossen werden, daß diese F_2 -Pflanze wahrscheinlich die Chromosomenkombination $15_{II} + 6_I$ ($2n = 36$) hatte. In diesem Falle waren in ihrer Nachkommenschaft die oben erwähnten verschiedenen Chromosomenkombinationen möglich.

Literatur

- Jenkins, J. A. and Thompson, W. P. 1930. Chromosome conditions in the second and third generations of pentaploid wheat hybrids. *Canad. Journ. Res.* 2.
- Kihara, H. 1924. Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. B.* 1.
- 1932. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. II. *Japan. Journ. Bot.* 6.
- und Nishiyama, I. 1930a. Genomaffinitäten in tri-, tetra- und pentaploiden Weizenbastarden. (H. KIHARA: Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. I). *Cytologia* 1.
- and — 1930b. New aspects of chromosome behavior in pollen mother-cells of tri-, tetra- and pentaploid wheat hybrids. *Bot. Mag. (Tokyo)* 42.
- und Wakakuwa, Sh. 1935. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. IV. *Japan. Journ. Bot.* 7.
- Matsumura, S. 1936a. Beziehungen zwischen Chromosomenzahlen und Sterilität sowie einigen morphologischen Eigenschaften in der F₂-Generation des Bastardes *T. polonicum* × *T. spelta*. (H. KIHARA et alii: Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. V). *Japan. Journ. Bot.* 8.
- 1936b. Chromosome numbers in male germ cells of pentaploid hybrids in wheat. (Japanese). *Japan. Journ. Gen.* 12.
- 1936c. Weitere Untersuchungen über die pentaploiden *Triticum*-Bastarde. VI. *Japan. Journ. Bot.* 8.
- Moriya, M. 1932. Chromosomenzahlen und Fertilitätsverhältnisse in der Nachkommenschaft eines hypopentaploiden *Triticum*-Bastards mit 34 somatischen Chromosomen. *Japan. Journ. Gen.* 8.
- Stevenson, F. 1930. Genetic characters in relation to chromosome numbers in a wheat species cross. *Journ. Agr. Res.* 41.
-

Timing Unbalance at Meiosis in the Pollen-sterile *Lathyrus odoratus*

By

Margaret Upcott

John Innes Horticultural Institution, London

A form of *Lathyrus odoratus* which has sterile pollen although the ovules are fertile was described by Bateson, Saunders and Punnett in 1905. The abnormality appeared in their breeding experiments along with factors determining flower colour or pollen shape. They showed that it was the result of the action of a factor now designated (s). Its inheritance and general cytological properties have already been described by Fabergé (1937).

The development of the male gamete is more liable to be upset by the action of genes than that of the female, owing, it is said, to its longer and more complicated life. A considerable number of such genes are known in plants, of which there are fifteen in *Zea mays* alone (Beadle 1932 b). Different genes affect the pollen of this plant at different stages of its development so that in some cases no visible abnormality is produced. Sterility may be due to "asynapsis", to the occurrence of supernumerary divisions following meiosis, or to the failure of cell-wall formation (Beadle 1930, 1931, 1932 a).

These and other cases in *Crepis* (Richardson 1935) etc., largely depend on abnormal timing relationships. The gene for pollen sterility in *Lathyrus* also alters these relationships, but in an entirely different way.

Material and Methods

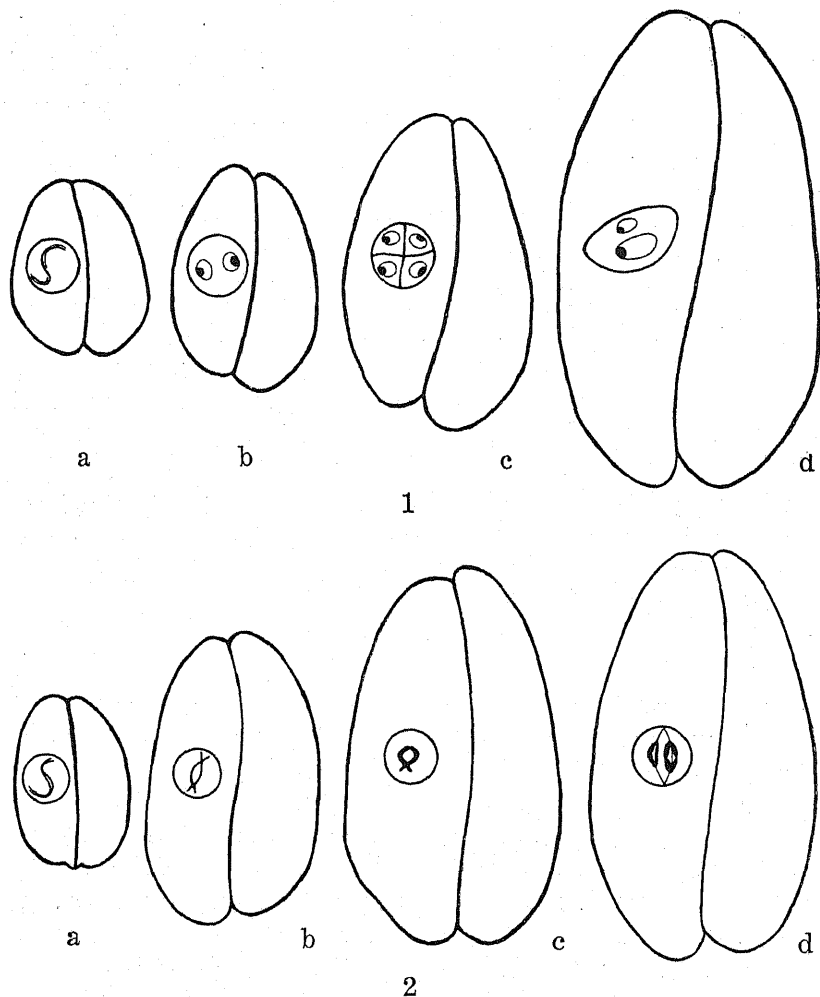
The material was obtained from the genetical crop of *L. odoratus* growing in this Institution. Buds were taken from different plants and from different families, but no differences between them were detected.

The usual method of fixing in medium Flemming or some similar fixative is useless for the pollen-sterile plants, because the bivalents contract greatly and run together into an amorphous mass. The shape of the spindle however can be shown by this method. For observation of chromosome morphology, aceto-carmin was used exclusively. Anthers were teased out in aceto-carmin without prefixing, a little iron added, and the slide warmed slightly. These preparations cannot be made permanent as the cells collapse, pre-

sumably under the action of the xylol. By ringing the temporary preparations, however, they can be made to last about a week.

Duration of Meiosis

The time taken for meiosis to be completed can be measured directly only by observing the living cells. An estimate of the length of the different stages may be made indirectly by various means such as the number of anthers containing pollen-mother-cells at a given stage, or by the size of the anthers at different stages of development. I have used the latter measure in the present case.



Figs. 1 and 2. Outlines of anthers at various stages of development ($\times 30$). The stage of the pollen-mother-cells is represented diagrammatically on each anther. 1. Normal anthers. 2. Sterile anthers.

On this scale, meiosis in the normal *Lathyrus odoratus* is rapid since there is little growth between pachytene and the second division (Fig. 1, a and b). By the time the tetrads are formed, however, a marked increase in growth has occurred, and this continues until just before the flower opens when the anthers contain ripe binucleate pollen (Fig. 1, c and d).

In the sterile plants, the growth of the anthers proceeds at the usual rate, but the prophase stages of meiosis last much longer than in the normal. At pachytene there is little difference in size between the two (Fig. 2, a) but at diplotene the sterile anthers are equal in size to normals containing tetrads (Fig. 2, b). By the time the anthers have attained their maximum size, the pollen-mother-cells have reached metaphase or first anaphase (Fig. 2, d). Degeneration sets in at this stage and no further development occurs.

Using the growth of the anthers as a measure of time, we see therefore that the first division of meiosis in the sterile plant takes as long at the whole development in the normal, from the end of pachytene to the formation of binucleate pollen (Fig. 3).

As a result of this prolongation of the prophase stages it follows that after

pachytene every living anther of the sterile plant contains pollen-mother-cells at some stage of the first division. When the anthers reach their maximum size, that is to say at the first anaphase, the cells begin to die, so that when the flower opens the anthers are shrivelled and therefore smaller than the normal.

The stages which are most prolonged are those during which spiralsation and terminalisation take place. From this abnormality then, we may observe directly the effect of time upon these processes.

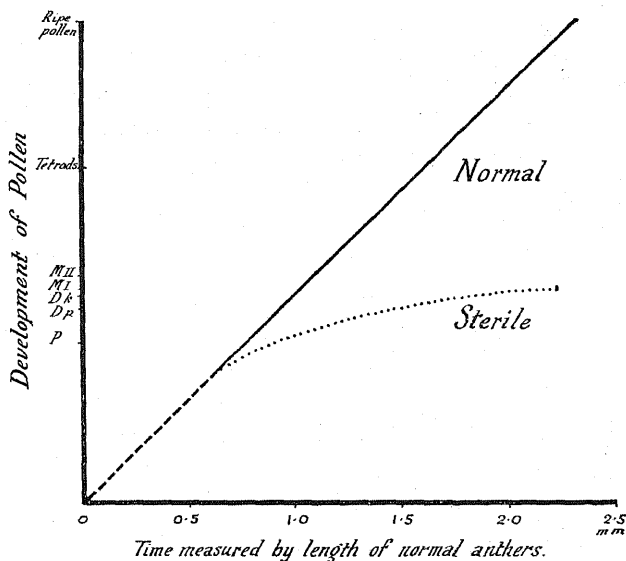


Fig. 3. Graph showing the relationship of growth of anther to development of pollen-mother-cells in the normal and sterile plants.

Meiosis in the Male-Sterile

The somatic complement of *Lathyrus odoratus* consists of seven pairs of chromosomes which differ slightly in length. Each of these can be recognised at mitosis but at meiosis only one pair is distinguishable. This one (A) carries a trabant on the short arm, at which point the nucleolus is attached (*cf* chromosome 6 in *Zea mays*, McClintock 1933, Darlington 1934).

The later stages of prophase in the sterile plants differ from the normals in yet another respect besides their abnormal length.

They react differently to aceto-carmine. In normal plants no analysis of chiasma frequency is possible before metaphase because the earlier stages fix so badly that individual bivalents are not distinguishable. In the sterile plants, however, the bivalents are clear and distinct and the chiasma frequency and movement may be analysed and compared at all stages.

At early diplotene the bivalents are long and show occasional relic coils which might be mistaken for chiasmata (Fig. 5a). The A bivalent is still attached to the nucleolus, the point of attachment being marked by two deeply staining trabants. The amount of condensation of this and the other bivalents is not equal throughout their length, but is greater at one end. Such differential condensation has been observed also in *Agapanthus* and *Zea* (*cf* Darlington

1937) where it is at a maximum next to the centromere and at a minimum at the ends. In *Lathyrus*, however, most of the centromeres are median so that it appears that condensation begins at one end in these bivalents and gradually extends along them until all are equally condensed, as we find at late diplotene and diakinesis.

The nucleolus disappears before diakinesis but the time of its disappearance is variable. The bivalents may be relatively long and as yet uncontracted after its disappearance, or it may still be visible when the bivalents have almost reached diakinesis (Fig. 5, b and c). A second bivalent often lies close to it, but does not appear to be actually attached.

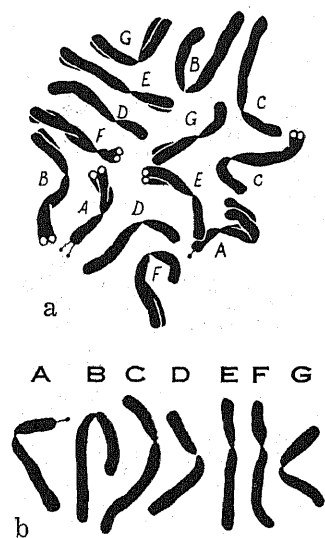


Fig. 4. a) Mitotic division from the root tip showing different chromosome types ($\times 3000$) (Flemming-gentian violet preparation). b) Haploid complement at anaphase drawn separately.

As diplotene passes to diakinesis, the bivalents become shorter and more contracted, and the number of terminal chiasmata greater. The centromere loop increases in size at the expense of the distal loops or of the distal ends which become part of the loop as the chiasmata terminalise.

At metaphase (Fig. 6, b) terminalisation is complete. As compared with the normal at this stage (Fig. 6, a) the chromosomes are shorter and thicker and the centromeres more pulled out, owing probably to their greater mutual repulsion.

The reduction in chiasma number by terminalisation renders invalid a comparison of the chiasma frequency in sterile plants at metaphase with that of normals, in which there is probably little reduction, as shown by the number of interstitial chiasmata still persisting. We may however compare the chiasma frequency in sterile plants at diplotene and diakinesis with that in normals at metaphase.

At these stages, we find a slight difference between the two (Table 1), but this is not greater than that which might be caused by changes in the external conditions such as temperature. In the samples from which the data are taken, the variance is lower in the sterile plants than in the normal, but this difference is not necessarily significant. A comparison with the later stages shows that

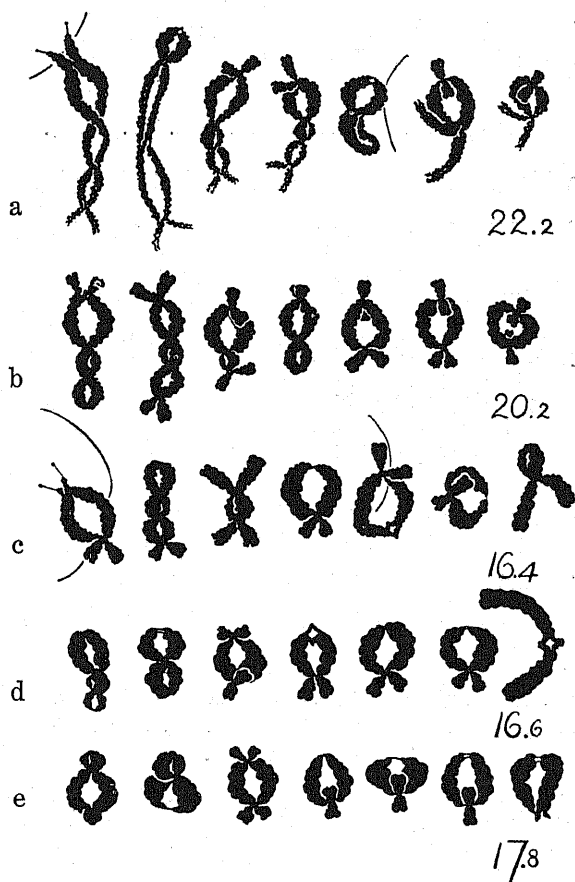


Fig. 5. Diplotene and diakinesis in a male sterile plant ($\times 2000$). The bivalents show differential condensation in the early stages and considerable terminalisation as contraction proceeds. The total number of chiasmata and the number terminal is given for each nucleus. The chiasma frequency of the first nucleus is unusually high so that the reduction in number with terminalisation is probably not as great as would appear.

Table 1. Comparison of chiasma frequencies in the normal and sterile *Lathyrus odoratus*

	Nos. of bivs. with diff. Nos of Xta.				Total Xta.	Total bivs.	Xta per biv.	Cross- over units	Vari- ance
	1	2	3	4					
Normal* (met.)	12	37	27	8	200	84	2.38	119	0.8036
Sterile (dipl. & diak.)	9	51	17	7	191	84	2.27	113	0.5812

* These data were obtained by the late Mr. L. H. A. Stone.

while no univalents are recorded at diplotene and diakinesis, several occur at metaphase in the same plant. Since chiasmata are a condition of pairing at all

stages after pachytene, we must assume that these univalents are the result of reduced pairing at pachytene, and since they have not been observed at the earlier stages, that the completeness of pairing at pachytene varies during the life of the plant. Probably therefore, the abnormality begins to act before this stage. Later we shall find another means of showing this to be the case.



Fig. 6. Metaphase I in the normal (a) and pollen sterile plants (b) ($\times 2000$). The latter shows complete terminalisation.

A considerable amount of data has been and is being collected on linkage in this plant (Punnett 1932, and various workers at this Institution, unpublished). I have therefore thought it worth while to give the chiasma-frequency in terms of cross-over units. On the assumption that one chiasma is equivalent to 50 cross-over units, the average length of the chromosomes in the normal and in the sterile plants is 119 and 113 units respectively.

From metaphase onwards, the behaviour is increasingly variable. In relation to the congression on the spindle, the nuclear membrane sometimes breaks down prematurely so that the bivalents are left for some time unorientated yet not visibly separated from the cytoplasm. Congression on the plate is often incomplete, one or more bivalents or pairs of univalents being left off it (Fig. 7). In acetocarmine, the limits of the spindle are not visible, but in Flemming-gentian violet preparations made for this purpose, they are distinct

although the shapes and configurations of the chromosomes are not. From these it is clear that the spindle is unusually long and narrow, reaching across the pollen-mother-cell, from wall to wall. In many cases it is straight but it may also be bent, in which case the bivalents seem to be crowded on to the inside of the curve. This length and narrowness are characteristic of the spindle at a normal anaphase rather than at metaphase.

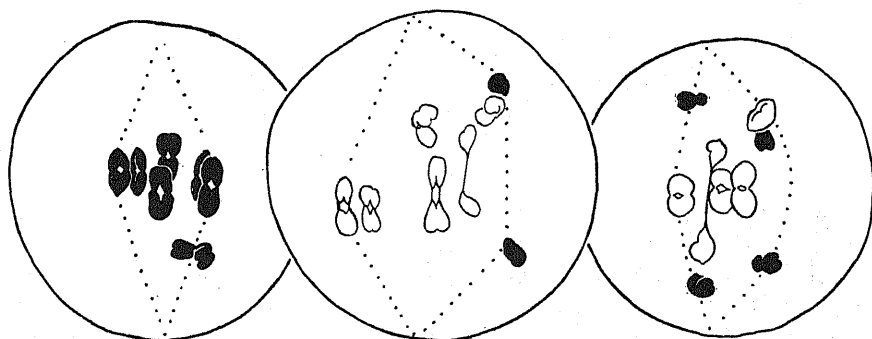


Fig. 7. Side views of metaphase I in sterile plants ($\times 1000$) showing failure of orientation and the occurrence of univalents. The probable position of the spindle is marked.

The similarity in shape between these spindles and those found in organisms with failure of pairing or large number of univalents also suggests that the time relations of the bivalents and of the spindle or, as Darlington (1936) assumes, of the centromere and the centrosome, are out of step. Since the time relations of the whole process are abnormal this is not unexpected.

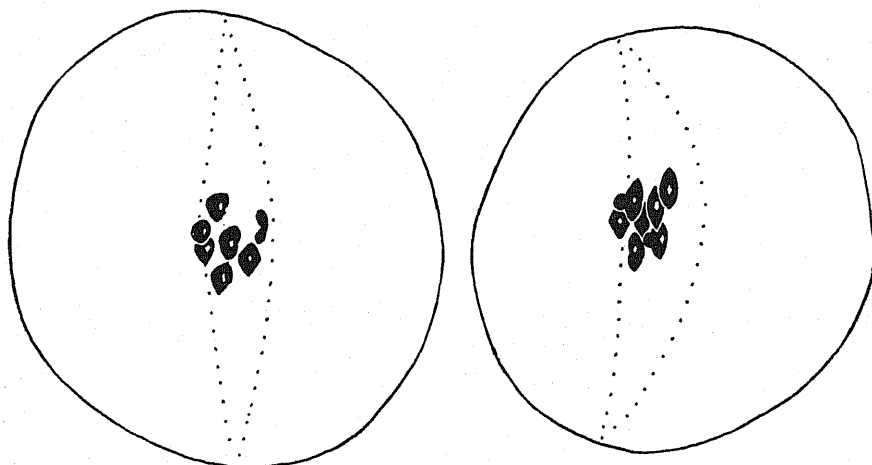


Fig. 8. Side views of metaphase ($\times 2000$) showing a very narrow and a bent spindle (Flemming-gentian violet preparation).

The lack of co-ordination between the spindle and the bivalents accounts also for the lag in congression at diakinesis after breakdown of the nuclear membrane, and in extreme cases, for the complete failure of congression of one or more bivalents.

The anaphase separation depends, of course, upon the degree of regularity of congression at the previous metaphase. Normal anaphases occur in which each nucleus contains seven chromosomes, but there may be non-disjunction of one or more pairs, or irregular separation with no clearly defined poles (Fig. 9). As a result of these

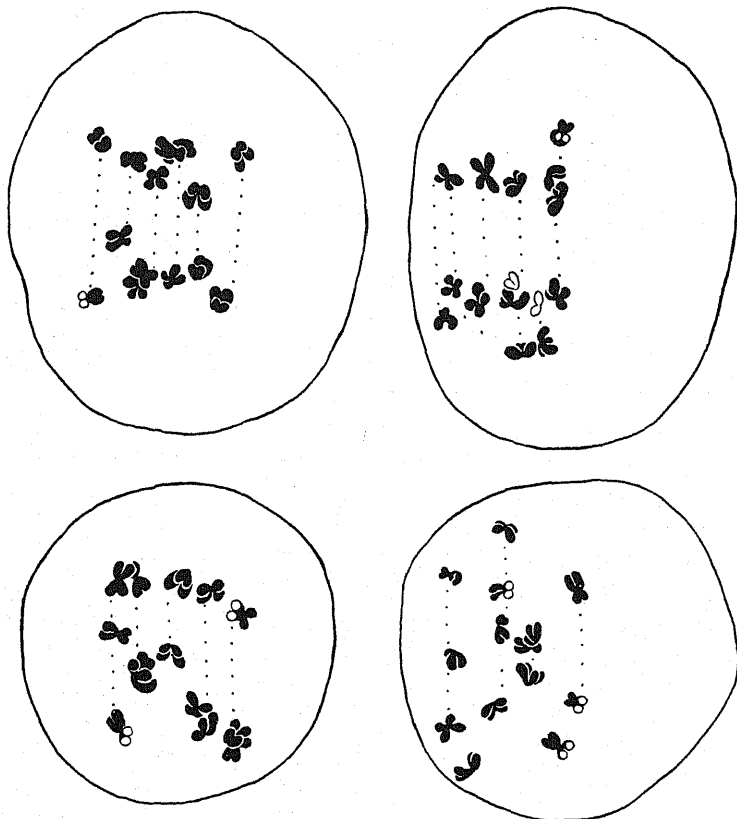


Fig. 9. Anaphases ($\times 1000$) showing irregular separation. The two chromatids in outline have been divided at the centromere by pressure in smearing.

anaphases we find interphases containing two, three or more nuclei of varying sizes and at various stages of degeneration (Fig. 10). For at this stage, the process evidently becomes completely dislocated. It breaks down and the cells die before the second division occurs. Occasionally two fairly normal looking nuclei appear to be in prophase of the second division, but they rarely get beyond this stage. The pollen-mother-cell wall degenerates, the cytoplasm stains more

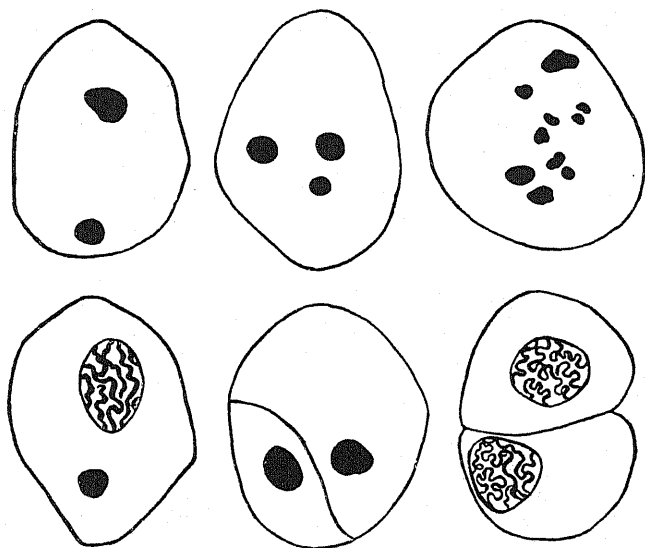


Fig. 10. Pollen-mother-cells ($\times 1000$) at various stages of degeneration after first anaphase.

deeply, and the nuclei become more and more indistinct, until they finally merge into the cytoplasm. When the flower opens the individual cells are no longer recognisable.

Exceptional Pairing in Reduplicated Segments

The material examined came from genetical stock which has been somewhat inbred for many generations. Nevertheless, in four pollen-sterile individuals, selected at random from three families in which this factor was segregating, chromatid bridges at anaphase showed that the plants were structurally heterozygous. Normal bivalent bridges and fragments were observed both at anaphase and telophase in approximately 5% of cells (Fig. 11 and 12) and in a few cases two bridges occurred in the same cell (Fig. 12, b). One case of a univalent bridge (Fig. 11, b) was observed such as would normally occur only

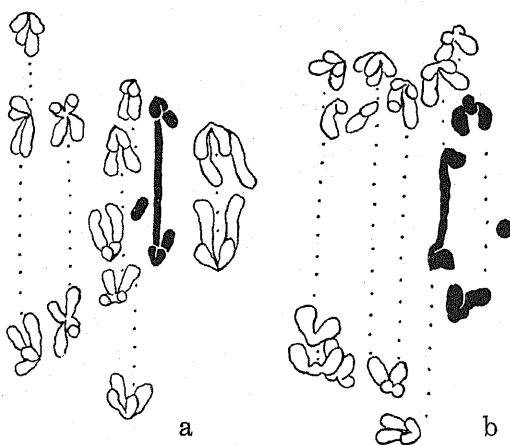


Fig. 11. Anaphases showing chromatid bridges ($\times 2000$). a) Bivalent bridge and fragment. b) Univalent bridge and fragment.

in a triploid. The bridge itself must have been a loop which has become a bridge at the first division owing to the precocious division of its centromere probably brought on by its lagging on the plate at anaphase, as happens with univalents of whatever origin.

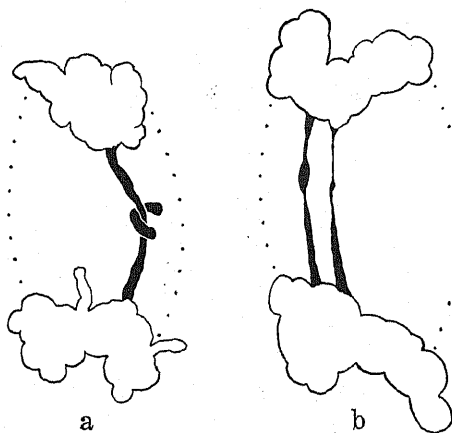


Fig. 12. Bridges at telophase ($\times 2000$). a) Fragment coiled round the bridge. b) Two bridges. Fragments not visible.

Since these bridges do not occur in the normal sisters of the sterile plants, they must be due to crossing-over, not in simple inversions, but rather in inverted segments which have been translocated and reduplicated and do not therefore usually pair. These segments may lie in non-homologous chromosomes. Their

existence has been revealed by the occurrence of a certain amount of pairing at meiosis in the haploids of most organisms where these have been examined (e.g. Katayama 1935, *cf.* Darlington 1937). Such intra-haploid pairing probably occurs also in triploids and other odd-multiple polyploids where complete pairing with normal homologues is impossible, but here it cannot always be distinguished from normal crossing-over (Upcott 1937). In diploids and even-multiple polyploids, it can occur only when normal pairing is interrupted or prevented.

A case comparable to the present one has been found by Lamm (1936), in *Secale*. In certain strains which had been inbred for several generations, bridges and fragments occurred in the pollen-mother-cells, although they are not present in the out-crossed plants of the same variety. In these strains, metaphase pairing and spiralisation are reduced, so that the meiosis may be described as semi-precocious. Evidently, normal pachytene pairing has been interrupted and in part replaced by intra-haploid pairing. The fact that bridges occur also in the sterile and similarly homozygous *Lathyrus* is an indication not only that similar reduplicated segments exist, but also that the timing abnormality begins before pachytene, a conclusion which had been reached on other grounds.

Correlated Effects of Delay on Meiosis

The present observations provide for the first time experimental evidence of the genotypic control of spiralisisation and terminalisation

which has been indirectly evident for some time (Darlington 1932). A similar case of this has been found among the Neuropterans by Naville and de Beaumont (1933). They illustrate meiosis in the male and in the female *Macronemurus appendiculatus*. From their illustrations, it appears that in the male the chromosomes are more contracted and the chiasmata more completely terminalised than in the female. The difference between the two sexes corresponds in a less degree to that between the sterile and the normal *Lathyrus*. In the one case the difference is due to the different conditions of development of the eggs and sperm, in the other to change in a single gene. The significance of this parallel is increased by the remoteness of the groups to which these organisms belong.

It is now possible to show directly what are the effects of delay in the later prophase stages of meiosis. We see that a greater degree of terminalisation occurs and associated with this, a greater degree of spiralisation. Terminalisation is presumably determined by the mutual repulsions of the chromosomes forming the bivalent and also by the length of time during which this repulsion is allowed to act. On the precocity theory, it is understandable that the greater spiralisation observed at meiosis should be due also to the greater length of time available, provided that it is a function of time. If more than the usual length of time is available, the degree of terminalisation and of spiralisation should be increased.

The present observations show that this is so, and that the two processes are correlated, the one being an internal, the other an external adjustment to the electrical surface conditions of the chromosomes.

Summary

Pollen sterility in *Lathyrus odoratus* is known to behave as a simple Mendelian recessive.

As compared with the normal meiosis, chromosome development in the sterile is delayed in relation to the growth of the anthers. This delay begins to take effect before pachytene.

That the timing is abnormal is shown by the fact that the sterile anthers containing pollen-mother-cells at the first metaphase are equal in size to normals containing binucleate pollen and by the fact that the spindle at metaphase is elongated as it is at a normal anaphase. The development of the chromosomes is delayed relative to that of the spindle. Associated with this delay is a difference of substrate conditions in the nucleus as shown by (i) its reaction to the fixative in prophase (ii) greater spiralisation (iii) greater terminalisation, indicating that these are all a function of rate of development.

After the first division, the timing disharmony apparently becomes so acute that further development ceases.

Bibliography

- Bateson, W. Saunders, E. R. and Punnett, R. C. 1905. Experimental Studies in the Physiology of Heredity. *Evol. Comm. of Roy. Soc.* II p. 80.
- Beadle, G. W. 1930. Genetical and Cytological Studies of Mendelian Asynapsis in *Zea mays*. *Cornell Univ. Exp. Sta. (Ithaca) Mem.* 129.
- 1931. A Gene in Maize for Supernumerary Cell Divisions Following Meiosis. *Cornell Univ. Exp. Sta. (Ithaca) Mem.* 135.
- 1932a. A Gene in *Zea mays* for Failure of Cytokinesis during Meiosis. *Cytologia* 3: 142-155.
- 1932b. Genes in Maize for Pollen Sterility. *Genetics* 17: 418-431.
- Darlington, C. D. 1932. The Control of the Chromosomes by the Genotype and its Bearing on Some Evolutionary Problems. *Amer. Nat.* 66: 25-51.
- 1934. The Origin and Behaviour of Chiasmata, VII. *Zea mays*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* 67: 96-114.
- 1936. The External Mechanics of the Chromosomes I-V. *Proc. Roy. Soc. B.* 121: 264-319.
- 1937. Recent Advances in Cytology. 2nd Edit. Churchill, London.
- Fabergé, A. C. 1937. The Cytology of Male-sterile *Lathyrus odoratus*. *Genetica* (in the press).
- Katayama, Y. 1935. Karyological Comparisons of Haploid Plants from Octoploid *Aegilotriticum* Diploid Wheat. *Jap. Journ. Bot.* 7: 349-380.
- Lamm, R. 1936. Cytological Studies in Inbred Rye. *Hereditas* 22: 217-240.
- McClintock, B. 1933. The Association of Non-homologous Parts of Chromosomes in the Mid-prophase of Meiosis in *Zea mays*. *Zeits. f. Zellf. u. mikr. Anat.* 19: 191-237.
- Naville, A. and de Beaumont, J. 1933. Recherches sur les chromosomes des Neuroptères. *Arch. d'Anat. micr.* 29: 199-243.
- Punnett, R. C. 1932. Further Studies of Linkage in the Sweet Pea. *Journ. Genet.* 26: 97-112.
- Richardson, M. M. 1935. Meiosis in *Crepis* II. *Journ. Genet.* 31: 119-143.
- Upcott, M. 1937. The Genetic Structure of *Tulipa*, II. Structural Hybridity. *Journ. Genet.* (in the press).

Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas in Pflanzenzellen

Von

Werner Lindenbein

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. KOERNICKE

(Mit 2 Tafeln)

Seit der Entdeckung der Protoplasmaströmung durch Corti im Jahre 1774 ist immer wieder die Frage aufgetaucht, inwieweit sich die Strömung in völlig unbeeinflussten Zellen findet und zur normalen Tätigkeit des lebenden Plasmas gehört. Es wurde sehr bald erwiesen, daß nicht nur eine Verletzung der Zelle, sondern auch des Zellverbandes, wie es bei der Herrichtung eines pflanzlichen Objektes zur mikroskopischen Beobachtung gänzlich unerlässlich ist, nicht ohne Wirkung auf die Plasmabewegung sei. Bewegung kann hervorgerufen oder auch sistiert werden. Eine besondere Bedeutung gewannen in dieser Beziehung daher diejenigen Objekte, welche eine mikroskopische Beobachtung ohne jede Verletzung ermöglichen, vor allem Zellen von Algen und Pilzen. Nachdem aber gezeigt war, daß auch ein leichter Stoß oder Druck auf die Zelle, auch das Verbiegen langgestreckter Zellen, nicht ohne Einfluß auf die Plasmabewegung sind, wollten die Stimmen nicht verstummen, welche die Plasmaströmung als eine durch Reize, die normalerweise nicht auf die Zelle einwirkten, hervorgerufene Erscheinung erklären. Weil die langgestreckten Internodial-Zellen der Charazeen, besonders aus der Gattung *Nitella*, mit denen sich der Verf. seit über 10 Jahren beschäftigt, ein besonders geeignetes Objekt darstellen, wurde der Frage nach der Ursprünglichkeit der Plasmabewegung erneute Aufmerksamkeit geschenkt.

Da bei den Nitellen wegen der mitgeführten tropfenförmigen Plasmaeinschlüsse die Strömung bei relativ schwacher Vergrößerung sehr gut zu beobachten ist, gestaltete sich die Methodik recht einfach. Kulturen von *Nitella flexilis* und *N. mucronata* wurden in schmalen, mit planparallelen Glaswänden versehenen Behältern in der üblichen Weise angesetzt. In solchen Kulturen wachsen die Charazeen durch Wochen und Monate ausgezeichnet. Bei geeigneter Aufstellung konnte nun ein großer Teil, der Internodien und Blätter verschiedensten Alters mit Hilfe eines horizontalen Mikroskopes, das bei einem Objektabstand von 4 cm noch eine genügend starke Vergrößerung aufwies, jederzeit beobachtet werden, ohne daß die geringste Präparation mit den Zellen vorgenommen werden mußte. Wenn in solchen Kulturen alle oder bestimmte Zellen dauernd Strömung

zeigen, ist nicht einzusehen, weshalb nicht auch an natürlichen Standorten der Pflanzen das Plasma solcher Zellen in Strömung begriffen sein sollte. Denn daß auf die Pflanzen in den Kulturen irgendwelche unnatürlichen oder schädlichen Reize wirkten, ist nicht anzunehmen, da sie in ganz normaler Weise wuchsen und fruchteten. Daß niemals Leitungswasser, das mit Messing oder Kupfer in Berührung gekommen war, verwendet wurde und daß nur mit Instrumenten aus Glas in die Kulturen hineingelangt wurde, bedarf wohl kaum der Erwähnung. Die so durch viele Jahre fortgesetzte mikroskopische Beobachtung von unter nahezu natürlichen Bedingungen wachsenden *Nitella*-Pflanzen, führten zu der sicheren Überzeugung, daß bei ihnen die lebhafteste Strömung des Plasmas in den Internodial- und Blattzellen eine normale Lebensäußerung sei und nicht auf präparative Eingriffe irgendwelcher Art zurückgeführt werden könne. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß nicht auch bei *Nitella* die Plasmaströmung eine Reizbewegung darstelle, nur müssen die veranlassenden Reize ständig vorhanden sein, normale Umweltfaktoren darstellen. Weiter geht hervor, daß auch unter veränderten Umständen, wie bei Lösung der Zelle aus dem Verband, bei Beobachtung unter dem vertikalen Mikroskop in unnatürlicher Lage und Beleuchtung, diese gleichen, normal schon vorhandenen, Umweltfaktoren noch wirksam sind.

Eine andere Frage ist freilich, ob die Intensität der Strömung, d.h. die Geschwindigkeit des Plasmas, auch ohne Veränderung äußerer Einflüsse Schwankungen unterworfen ist, oder ob zu einer bestimmten Konstellation der Außenfaktoren eine ganz bestimmte Geschwindigkeit gehört. Ehe aber auf die relative Geschwindigkeit eingegangen werden soll, seien einige Bemerkungen über die ermittelten absoluten Werte vorausgeschickt. Die in der Literatur vorliegenden Angaben stimmen im allgemeinen recht gut überein. HILLE RIS-LAMBERS (1926) findet für verschiedene Arten aus den Gattungen *Chara*, *Nitella* und *Tolypella* recht übereinstimmend bei 20° den Wert 57,6 μ /sec. HÖRMANN fand 1898 für 21° nur etwa 50 μ /sec. COOK gibt 1929 für *Nitella clavata* 73,1 μ /sec. an, während sich aus dem gleichen Jahr eine Angabe bei SILVIA COLLA findet, die von den mitgeteilten Befunden nicht unerheblich abweicht und auf 27 μ /sec. lautet. Nach meinen Beobachtungen schwankt, worauf wir noch zu sprechen kommen, die Geschwindigkeit auch bei derselben Temperatur nicht unerheblich und liegt zwischen 50 und 70 μ /sec. So lebhaft die Plasmabewegung uns unter dem Mikroskop auch erscheint, so legen demnach die einzelnen Teilchen nur etwa 30 cm in der Stunde zurück. Dabei weist nach den Angaben JOSINGS (1901) von den meist untersuchten Objekten *Chara* die

schnellste Strömung auf. Die entsprechenden Werte sind nach ihm für eine bestimmte Strecke: bei *Chara* 7,5 sec., *Elodea* 14, *Vallisneria* 10, *Tradescantia* 15 und *Alisma* 14 sec.

Die Methodik der Geschwindigkeitsermittlung ist bei allen Untersuchern die gleiche: Es wird für deutliche erkennbare mitströmende Teilchen mit einer Zehntel-Sekunden-Stoppuhr die Zeit gemessen, die zum Zurücklegen einer bestimmten absolut gemessenen Strecke benötigt wird. Es muß dabei aber berücksichtigt werden, daß es nicht gleichgültig ist, welcher Art und Größenordnung diese Teilchen sind. Wenn die Annahme richtig ist, daß die sichtbaren und daher allein messbaren Teilchen von der homogenen, optisch fast leeren plasmatischen Grundsubstanz passiv mitgeführt werden, so kann sich die Geschwindigkeit der mitgeführten Partikel nicht völlig mit derjenigen des Plasmas decken, sondern muß je nach der Größe der ersteren und der Viskosität des letzteren schwanken. BĚLEHRÁDEK (1924/25) hat versucht, von dieser Überlegung ausgehend, eine Methode zur Viskositätsbestimmung auszuarbeiten. Das Verhältnis der Geschwindigkeit des Plasmas, gemessen an den Mikrosomen, zur Geschwindigkeit mitgeführter Chloroplasten, gibt ihm bei *Elodea* ein Maß für die Viskosität des Plasmas ab: je geringer die Differenz, umso größer die Viskosität. Er findet, daß mit dem Alter der Zelle die Geschwindigkeit der Mikrosomen die gleiche bleibt, die der Chloroplasten aber zunimmt. Bei den Characeen liegen zwar die Chloroplasten normalerweise in der ruhenden wandständigen Plasmaschicht eingebettet, doch finden sich auch immer einige, die in das strömende Plasma hineingeraten sind, was man bei HÖRMANN, RHUMBLER, LINSBAUER u.a. erörtert findet. Ich habe verschiedentlich versucht, die Geschwindigkeit dieser Chloroplasten im Verhältnis zu der der Mikrosomen zu bestimmen. Da aber die Strömung nie ganz gleichmäßig verläuft, variieren die Ergebnisse der einzelnen Messungen und je mehr man die Messungen häuft, desto weniger eindeutig werden die Ergebnisse. Bei *Chara fragilis* wurden in einem unberindeten Internodium 120 μ zurückgelegt von

	Mikrosomen	Plastiden	Mikrosomen	Plastiden
in	2,7	2,6	2,6	2,3
	2,8	2,6	2,4	2,4
	2,7	2,5	2,4	2,5
	2,4	2,6	2,5	2,4
	2,2	2,6	2,6	2,4 Sekunden.

Der Durchschnitt von 10 Messungen beträgt für Mikrosomen 2,53, für Chloroplasten 2,49 Sekunden. Weitere 10 Messungen änderten das Ergebnis:

Mikrosomen	Plastiden	Mikrosomen	Plastiden
2,4	2,6	2,4	3 0
2,4	2,8	2,6	2,5
2,8	2,9	2,4	2,5
2,6	2,8	2,7	2,5
3,1	2,6		
2,5	2,6	Mittel 2,59	2,68.

Weitere 10 Messungen stellten etwa das erste Bild wieder her.

2,4	2,5	2,6	2,5
2,7	2,5	2,6	2,4
2,8	2,6	2,4	2,4
2,6	2,6	2,3	2,6
2,4	2,4		
2,6	2,6	Mittel 2,54	2,51.

Der Mittelwert der 30 Messungen ergibt schließlich folgendes Ergebnis: Geschwindigkeit der Mikrosomen 2,55, der Chloroplasten 2,56. Das würde auf eine sehr hohe Plasmaviskosität schließen lassen. Ganz entsprechend waren die Ergebnisse von Messungen, die an Rhizoiden derselben Spezies vorgenommen wurden. Hier betrug in einem Fall die mittlere Geschwindigkeit der Mikrosomen 4,62, die der durch reichliche Stärkebildung stark angeschwollenen Plastiden 4,63 sec. für die gleiche Strecke von 120 μ Länge. Derartige Beobachtungen führten mich stets zu dem gleichen Ergebnis, daß bei den Charazeen ein meßbarer Unterschied zwischen der Geschwindigkeit der Mikrosomen und der gelegentlich mitgeführten Plastiden nicht besteht.

In den angeführten Fällen wurden die Geschwindigkeitsmessungen bei Mikrosomen und Plastiden an derselben Stelle des Zellängsschnittes durchgeführt. Verfolgt man aber einen bestimmten tropfenförmigen Plasmaeinschluß bei schwächerer Vergrößerung über eine längere Wegstrecke, so kann man leicht feststellen, daß nicht alle Teilstrecken, in die man die Gesamtstrecke am besten mit Hilfe des Okularmikrometers zerlegt, mit der gleichen Geschwindigkeit durchmessen werden. Es wurde dabei so vorgegangen, daß zunächst die Geschwindigkeit, mit der die ersten zehn Teilstriche zurückgelegt wurden, festgestellt, während der Tropfen die 2. zehn Teilstriche durchlief, die Uhr wieder auf Null gesetzt und dann die nächste Teilstrecke wieder gemessen wurde. Man erhält so fünf Ablesungen während des Durchganges durch die 100 Teilstriche des Okularmikrometers. Um nicht den betreffenden Tropfen aus dem Auge zu verlieren, wurden die Ablesungen und Notizen von einer 2. Person ausgeführt, während der Beobachter die Stoppuhr bediente, ohne das Auge vom Okular zu entfernen. Auf diese Weise wurden z.B. folgende 15 Tropfen unmittelbar nacheinander verfolgt:

Teilstriche	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
10-20	6,1	5,6	6,2	6,4	6,5	7,3	6,3	6,0
30-40	5,1	5,6	<u>5,7</u>	5,5	5,6	<u>6,1</u>	5,4	5,4
50-60	5,1	5,4	8,0	5,2	6,1	<u>6,3</u>	5,5	5,3
70-80	5,0	5,3	7,5	5,2	5,3	6,2	5,7	5,5
90-100	<u>4,9</u>	<u>5,2</u>	7,6	<u>5,0</u>	<u>4,9</u>	6,7	<u>5,0</u>	<u>4,7</u>
	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	
10-20	6,3	6,6	6,8	5,7	6,6	6,3	7,1	
30-40	5,2	5,1	5,8	5,2	5,7	5,0	6,10	
50-60	5,5	4,8	<u>5,6</u>	5,1	6,1	4,9	6,5	
70-80	5,5	4,7	5,9	5,2	6,3	<u>4,7</u>	6,4	
90-100	<u>4,9</u>	<u>4,5</u>	5,6	<u>4,3</u>	<u>5,4</u>	<u>4,7</u>	<u>5,6</u>	

Die Größe der verfolgten Plasmaeinschlüsse war verschieden, ihre Form konnte sich während des Strömens ändern. Meist bestand eine solche Gestaltsänderung in einem Übergehen von der Kugel zum Ellipsoid. Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß die Geschwindigkeitsmaxima nicht regellos verteilt sind, sondern bis auf wenige Ausnahmen in der letzten Teilstrecke gemessen wurden. Die Ausnahmen, welche übrigens zeigen, daß die gefundene Regelmäßigkeit nicht auf einem Beobachtungsfehler beruht, zeigen alle die Maxima in der 2. oder 3. Teilstrecke. Die Minima liegen alle mit einer Ausnahme in der ersten der kontrollierten Teilstrecken. Diese Beobachtungen sind für die Methodik der Geschwindigkeitsbestimmung von Bedeutung. Es geht aus ihnen hervor, daß man bessere Durchschnittswerte erhält, wenn man nicht alle Ablesungen an ein und derselben eng begrenzten Stelle ausführt, sondern entweder an verschiedenen Stellen, oder den Mittelwert aus einer möglichstlangen Strecke errechnet. Was sodann die Ursache für die Vergrößerung oder Verminderung der relativen Geschwindigkeit an einer bestimmten Stelle anlangt, so könnte die Erscheinung wohl rein physikalisch zu erklären sein, indem hier irgendwelche Hindernisse oder Reibungen fehlen resp. vorhanden sind. Jedenfalls ließ sich feststellen, daß sich auch der entgegengesetzt gerichtete Strom ganz entsprechend verhielt. Zeigte z.B. der eine Strom beim Eintritt in das Gesichtsfeld die größte Geschwindigkeit, bei seinem Austritt die geringste, so wies der entgegengesetzte bei seinem Eintritt die geringste, bei seinem Austritt die größte auf. Als Beispiel seien folgende nacheinander ausgeführte Messungen angegeben:

	1.	2.	3.	4.	5.	Teilstrecke
Eintritt:	7,1	6,1	6,5	6,4	5,6	Austritt
Austritt:	7,2	6,2	5,9	5,4	5,0	Eintritt.

Beide Ströme fließen also unbeschadet ihrer Richtung an denselben Enden der Zelle mit derselben relativen Geschwindigkeit.

Setzt man Geschwindigkeitsmessungen längere Zeit hintereinander fort, so kann man häufig die Feststellung machen, daß die Strömungsgeschwindigkeit leichteren oder stärkeren Schwankungen ausgesetzt ist. So wurden z.B. 25 Beobachtungen hintereinander etwa eine halbe Stunde lang an derselben Zellenstrecke ausgeführt. Während der ersten 10 Messungen fiel die Geschwindigkeit kontinuierlich von 4,23 auf 4,84, zeigte während der nächsten 10 Messungen geringe Schwankungen, die in eine schwache Beschleunigung übergingen, die sich dann weiterhin fortsetzte. Stärker werden die Schwankungen, wenn man die Beobachtung über größere Zeiträume ausdehnt. Allerdings muß man dann die jeweilige Temperatur berücksichtigen, wenn es auch nicht richtig ist, daß zu einer bestimmten Temperatur eine ganz bestimmte Strömungsgeschwindigkeit gehöre, wie HÖRMANN anzunehmen scheint.

6. August 11 Uhr 30	20°	3,85	10. August 16 Uhr 30	22°	3,37
16 „	20°	3,83	11. „ 10 „	24°	2,83
7. „ 10 „	20°	3,76	17 „	24°	3,21
13 „	21°	3,69	12. „ 16 „	21°	3,61
8. „ 10 „	20°	3,80	16. „ 10 „	24°	2,93.
10. „ 9 „	23°	3,21			

Werden die Zellen unter ungünstigeren Bedingungen gehalten, z.B. in Petrischalen liegend, so tritt ganz allgemein eine kontinuierliche Verlangsamung der Strömung ein, die aber erst zum Stillstand kommt, wenn die Zellen deutliche Desorganisationserscheinungen zeigen. Z.B.:

19. Mai	22°	3,07	25. Mai	22°	3,66
20. „	22°	3,10	26. „	22°	3,82
21. „	23°	2,83	27. „	22°	4,35
22. „	22°	3,09	28. „	22°	4,62
23. „	22°	3,32	29. „	22°	4,87.
24. „	22°	3,63			

Eine gelentliche, an einem unberindeten Internodium von *Chara fragilis* gemachte Beobachtung zeigt, daß solche Verlangsamung der Strömung mittelbar zustande kommen kann. Nachdem das Plasma dieser Zelle tagelang mit annähernd der gleichen Intensität geströmt war, trat etwa am 10. Tag eine deutliche Verlangsamung auf. Gleichzeitig zeigte sich in der Zelle ein großer dunkelbrauner Klumpen einer körnigen Masse, offenbar absterbendes oder doch geschädigtes Plasma darstellend. Dieser Plasmaballen hat infolge seiner Größe und Gestalt sehr viel mehr Reibung zu überwinden als die übrigen Partikel, so daß seine Geschwindigkeit bedeutend langsamer ist. Dadurch häufen sich die anfangs im ganzen Plasma der Zelle

zerstreuten ölartigen Tropfen hinter ihm an, da sie ihn einholen, jedoch nicht an ihm vorbeikönnen. Einige Stunden später sind alle Tropfen in einer langen Reihe hinter dem Plasmaballen angehäuft und folgen ihm kometenschweifartig. Es schien, daß auch die Mikrosomen das Hindernis schwer passieren konnten, so daß, ohne daß eine sichtbare Stauung aufgetreten wäre, das gesamte strömende Plasma schließlich die Geschwindigkeit des Plasmaballens anzunehmen gezwungen war. Ob freilich stets derartige Hindernisse die Ursache der Verlangsamung sind, ist nicht erwiesen. Jedenfalls ist die verschiedentlich in älteren Kulturen von mir beobachtete Erscheinung der Plasmaballung als Desorganisation anzusprechen und ist nicht mit den von RHUMBLER (1902), STÅLBERG (1927) und LINSBAUER (1929) eingehender behandelten, in der Vakuole rotierenden Plasmaballen identisch. Die von mir beobachteten Plasmaanhäufungen unterscheiden sich dadurch, daß sie im strömenden Plasma sich befinden, nicht rotieren, sondern weiter geschoben werden, infolgedessen auch nicht abgerundet erscheinen, sowie auch in ihrer Struktur.

Um die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Plasmaströmung vom Alter der Zellen zu studieren, erwies sich *Nitella flexilis* als ein sehr geeignetes Objekt. In embryonalen Zellen ist niemals Strömung zu beobachten. Sobald das Streckungswachstum beginnt, gerät das Plasma in lebhafte Strömung. In der nächst älteren Internodialzelle kann die Geschwindigkeit noch gesteigert sein, in der nächsten ist sie merklich geringer und zeigt die Intensität der übrigen Internodien. Es scheint, daß die Strömungsgeschwindigkeit mit der Intensität des Wachstums in Beziehung steht und eine große Periode aufweist. Es seien nur folgende Beispiele angeführt:

1.	Internod.	—	—	—
2.	„	6,5	5,6	<u>5,1</u>
3.	„	<u>5,5</u>	<u>4,9</u>	6,1
4.	„	7,3	6,2	6,2.

Schon VELTEN (1873/1876) zog aus den Beobachtungen, die er am strömenden Plasma machte, Schlüsse auf die Struktur und den feineren Bau des Protoplasmas und gelangte zu einer recht komplizierten Auffassung. Seine Annahme fester, fibrillärer Strukturen, die das strömende Plasma in bestimmte Bahnen lenkte, hat namentlich für Pflanzenhaare eine Reihe Verfechter gefunden, doch wird von allen neueren Autoren die Annahme fester Strukturen im pflanzlichen Protoplasma geleugnet. Daß man bei Charazeen schneller und langsamer strömende Zonen unterscheiden könne, wurde oft behauptet. Was den Längsverlauf der Strömung angeht, so haben wir dergleichen oben selbst beschrieben, die Dicke

der strömenden Schicht war aber nicht groß genug, um mit Sicherheit verschiedene nebeneinander gelegene Zonen unterscheiden zu können; die gleiche Bemerkung findet sich bei LINSBAUER (1929). Mit absoluter Sicherheit sind nur die strömende und die ruhende Plasmaschicht, in welche die Plastiden eingebettet sind, zu unterscheiden. Indirekte Schlüsse auf die plasmatische Struktur läßt aber die Beobachtung der Plastiden, ihre Gestalt und Verteilung zu.

Seit langem ist bekannt, daß die Plastiden in den Zellen von *Chara* und *Nitella* langgestreckt sind, wo das Plasma strömt, am Indifferenzstreifen jedoch kuglig abgerundet erscheinen. Der Indifferenzstreifen selbst ist frei von Plastiden, was nicht verwunderlich erscheinen kann, da nach VOTAVA (1914) hier die Membran eine schwach ins Zellumen hineinragende Längsleiste gebildet hat, eine Angabe, die allerdings m.W. bisher nie bestätigt wurde und mir zu beweisen nicht gelang. Nach der Darstellung LUNDEGÅRDHS (1922), der sich auf HÖRMANN, KÜHNE und RHUMBLER stützt, werden die Plastiden passiv von der Strömung in die Länge gezogen. Dafür, daß die Plastiden Flüssigkeitscharakter haben und vom umgebenden Plasma passiv geformt werden können, führt KÜSTER (1935) eine Reihe von Beispielen an. Wenn aber in unserem Fall wirklich die Strömungen für die Form der Plastiden verantwortlich gemacht werden soll, dürften in jungen Zellen die Plastiden nicht langgestreckt erscheinen, ferner müßte bei vorübergehendem Stillstand der Strömung auch eine Veränderung der Plastidengestalt zu beobachten sein. Meine darauf gerichteten Beobachtungen haben ergeben, daß in jungen Zellen, in denen noch keine Strömung aufgetreten ist, die Plastiden allerdings rundlich erscheinen. Ein vorübergehender Stillstand, etwa durch einen schwachen Stoß auf die Zelle ausgelöst, hat keinerlei Einfluß auf die Plastidengestalt. Starke Quetschung jedoch, die einen Teil der Zelle zerstört, ruft sofort auch in den ferner gelegenen Teilen der Zelle Abrundung der Plastiden hervor. Die gleiche Erscheinung, die sogar oft mit einer vollständigen Verwischung des Indifferenzstreifens verbunden sein kann, läßt sich erreichen durch Abtöten mit Alkohol, wenn dieser sehr vorsichtig an die Zelle herangebracht wird. Eine starke Alkoholgabe führt dagegen sofort zur Gerinnung und fixiert die Plastiden in ihrer Gestalt, die sie zur Zeit des normalen Strömens hatten. Derartige Veränderungen der Plastidengestalt sind aber stets irreversibel, stehen also mit viel tiefer greifenden Strukturveränderungen in Zusammenhang, als es eine bloße Sistierung der Plasmaströmung darstellt. Das bestätigt durchaus die Beobachtungen LINSBAUERS. Auch seiner Schlußfolgerung, daß die Ursache der Form der Plastiden in einer besonderen physikalisch-chemischen Struktur des sie

umhüllenden Plasmas zu suchen sei, ist unbedenklich zuzustimmen. Seine Auffassung, daß auch die Plasmaströmung bei Charazeen an die Unversehrtheit des Außenplasmas gebunden sei, ist nach meinen Beobachtungen gut begründet.

Von Plasmastrukturen ist in fixierten Präparaten wenig zu erkennen (Abb. 1 bis 3). Zwar unterscheidet sich das Plasma in älteren langgestreckten Zellen, deren Lumen zum größten Teil von der Vakuole eingenommen wird, durch seine Grobkörnigkeit und stärkere Färbbarkeit von dem der jungen Zellen. Ferner kann man in gut fixierten Zellen erkennen, daß das Plasma der ruhenden Wandschicht dichter und feiner strukturiert erscheint als das strömende der Vakuole zunächst liegende Plasma. Wabige oder schaumige Struktur läßt sich nur gelegentlich, wohl als Artefakt, in jungen embryonalen Zellen nachweisen, niemals dagegen im Plasma der Internodien.

Die Form der Plastiden ist bei Anwendung des Flemmingschen Gemisches meist recht gut erhalten. Der Unterschied der Plastidenform in den langen Internodialzellen und in den nichtströmenden jungen Zellen ist auffallend genug. Nur in ersteren findet man ausgesprochen in die Länge gezogene Chloroplasten (Abb. 4 bis 6).

Daß das Plasma eine dem Wachstum folgende spiralförmige Struktur haben müsse, ist nach KÜSTER aus dem Verhalten der Plastiden, die sich bei den Charazeen zu schraubenartig gewundenen Ketten zusammenlegen, zu schließen. Auf die gleichen strukturellen Eigentümlichkeiten des ruhenden Plasmas ist die Strömungsrichtung des strömenden zurückzuführen. Die entgegengesetzte Ansicht RHUMLERS, nach der die Strömung die Lagerung der Chloroplasten bestimmt, hat bereits LINSBAUER eingehend behandelt und im Zusammenhang mit der NÄGELISCHEN Auffassung gewertet. Die von RHUMBLER erwähnte Tatsache, daß vom Plasma mitgeführte Chloroplasten in zufällig vorhandene Lücken der Plastidenreihen wieder eingefügt würden, habe ich ebensowenig wie LINSBAUER je gesehen. Da die Reihenanzordnung durch Schädigung des Außenplasmas gestört werden kann, also auch durch Veränderung der physikalischen Beschaffenheit des letzteren, scheint sie rein physikalisch erklärbar zu sein. Es sei darauf hingewiesen, daß wir auch in gewissen Schäumen eine saubere Reihenanzordnung der einzelnen Bläschen beobachten können (Abb. 8).

Wenn es gelingt, Übergangsbilder zu fixieren, welche die Chloroplasten beim Abkugeln durchlaufen, sind die von LINSBAUER beobachteten Fusionen sehr deutlich zu erkennen (Abb. 7). Die eigentümlichen Formen und die oft haarfein ausgezogenen Enden der Plastiden lassen auf starke Bewegungen innerhalb der „ruhenden“

Plasmaschicht im Augenblick des Absterbens, d.h. während des Nachlassens der im lebenden Zustand in ihm vorhandenen Spannungen, schließen.

Zusammenfassung

Die in den Zellen der Characeen zu beobachtende Plasmarotation muß als eine spontane Lebenserscheinung angesehen werden, die nicht erst auf Eingriffe präparativer Art hin auftritt. Die sie veranlassenden inneren und äußeren Reize gehören zur normalen Umwelt der Zelle. Die Strömungsgeschwindigkeit ist Schwankungen unterworfen, die sowohl auf äußere Reize als auch auf innere Bedingungen, Alter der Zelle, innere und äußere Reibung, zurückgeführt werden müssen. Die Partien größter und geringster Geschwindigkeit liegen für längere Zeit innerhalb einer Zelle fest.

Strömung und Plastidengestalt sind abhängig von bestimmten, dem ruhenden Außenplasma eignenden Strukturen. Bei Schädigung des Außenplasmas treten Strukturveränderungen ein, durch welche die Strömung sistiert wird und die Plastidenform wechselt. An Mikrotomschnitten fixierten Materials sind charakteristische Übergangsbilder, welche die Plastiden bei diesem Vorgang durchlaufen, nachweisbar.

Literatur

- Belehradek, Jan, 1924/25. Publ. Fac. méd. Brno 3: 1-28; 28 fig.
 Colla, S., 1929. Protoplasma 6: 438-448.
 Cook, S. F., 1929. Journ. Gen. Physiol. 12: 793-813; 7 fig.
 Hille Ris-Lambers, M., 1926. Temperatuur en protoplasmaströming. Diss. Utrecht 76 S.
 Hörmann, G., 1898. Studien über die Protoplasmaströmung bei den Characeen. Jena.
 Josing, E., 1901. Jahrb. wiss. Bot. 36: 221.
 Kühne, A., 1898. Zeitschr. f. Biol. N. F. 18: 85.
 Küster, E., 1935. Die Pflanzenzelle. Jena.
 Linsbauer, K., 1929. Protoplasma 5: 563-621, 19 Textfig.
 Lundegårdh, H., 1922. Zelle und Cytoplasma. Handb. d. Pflanzenanat. I.
 Rhumbler, L., 1902. Ztschr. f. allg. Physiol. 1: 279.
 Stålberg, N., 1927. Studien über d. Zellinhalt v. *Nitella opaca*. Lund.
 Velten, W., 1872. Botan. Zgt. 30: 645.
 Votava, A., 1914. Österr. Bot. Ztschr. 64: 442.

Erklärung der Tafeln

Tafel 9

- Abb. 1. Längsschnitt durch einen Sproß von *Chara*.
 Abb. 2. Plasmatischer Wandbelag in Rindenzellen.
 Abb. 3. Plasma einer Internodialzelle mit Einschlüssen.
 Abb. 4. Eine Reihe Plastiden im Längsschnitt einer Internodialzelle.

Tafel 10

- Abb. 5. Langgestreckte Chloroplasten einer Internodialzelle.
 Abb. 6. Rundliche Chloroplasten in einer jungen Blattzelle.
 Abb. 7. Durch Schädigung des Außenplasmas hervorgerufene Chloroplastenformen.
 Abb. 8. Reihenanordnung von Luftblasen in Leinölschaum.



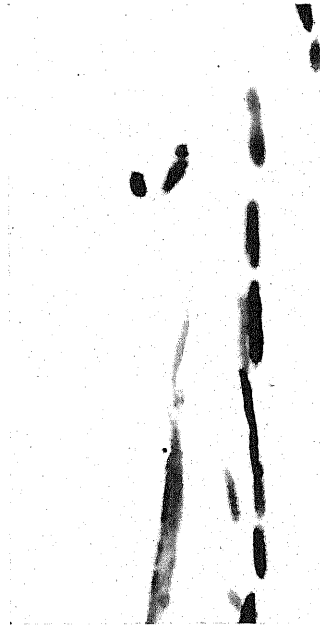
1



2

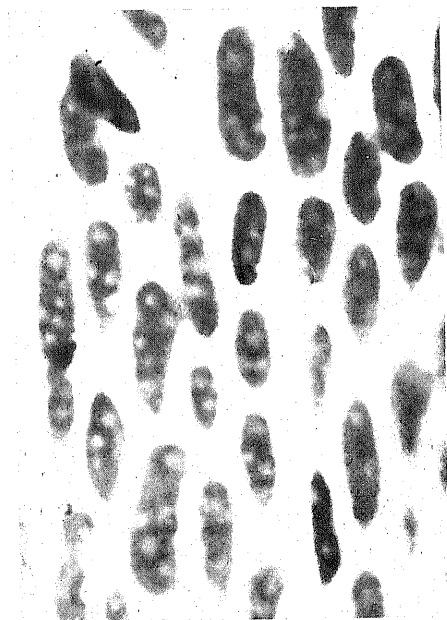


3

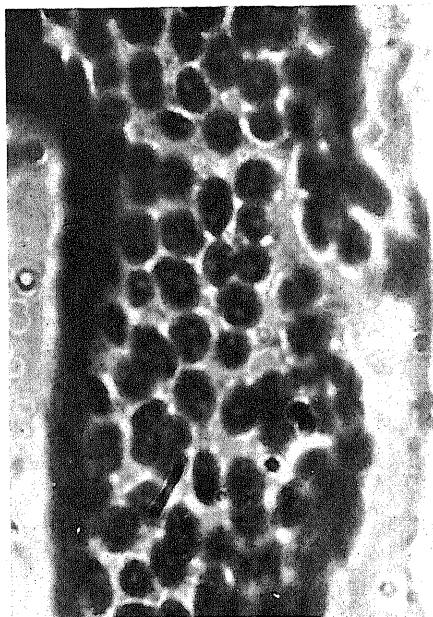


4

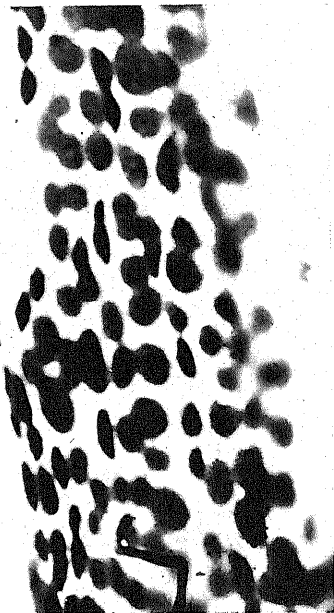
Lindenbein: Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas
in Pflanzenzellen



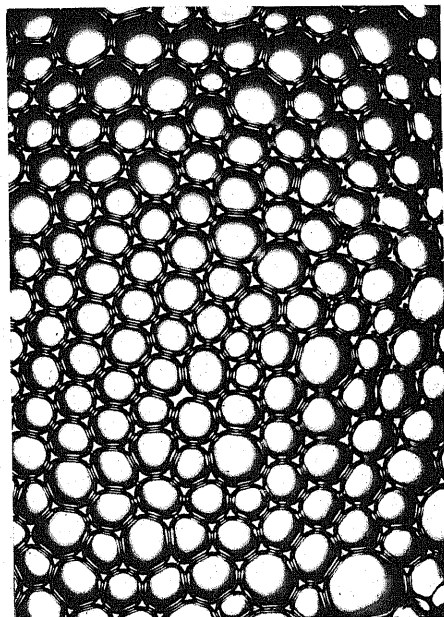
5



6

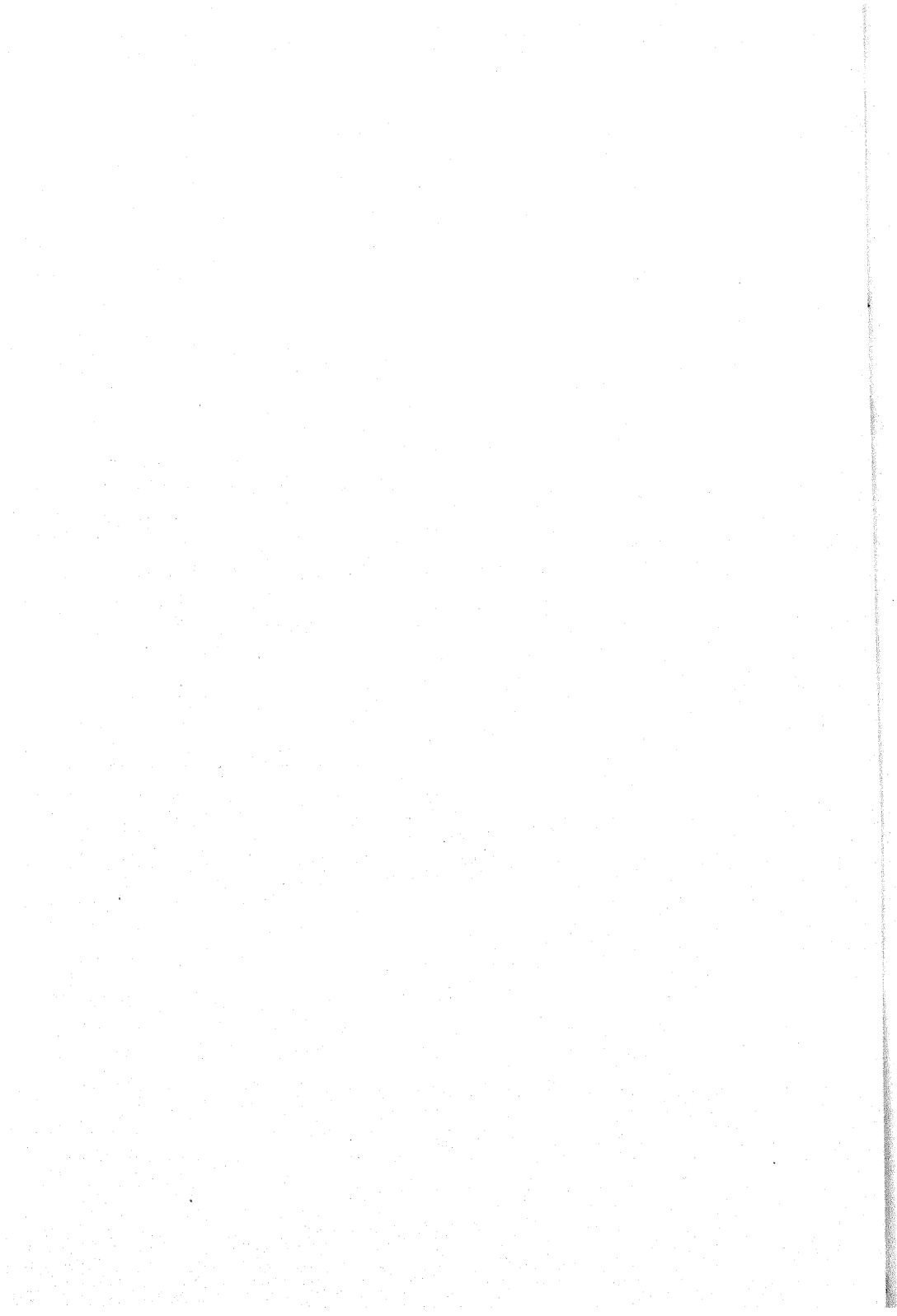


7



8

Lindenbein: Beobachtungen über Bewegung und Struktur des Protoplasmas
in Pflanzenzellen



The Behaviour of the Nucleolus in the Pollen Mother Cells of Certain Members of *Nymphaeaceae*

By

Girija Prasanna Majumdar,

Professor of Botany, Presidency College, Calcutta
and

Robindra Mohon Datta, M. Sc.

Research Student, Presidency College, Calcutta

During the course of investigation on the cytology of several species of the Nymphyæaceae, we came across the interesting behaviour of the nucleolus in the pollen mother cells of *Victoria regia*, *Nymphaea Sulfurea*, *Nymphaea rubra* and *Nymphaea lotus*, which we desire to record in this note.

In the resting stage the nucleolus is deeply stained and situated mostly at the centre but sometimes it is also seen to lie near the periphery of the nuclear cavity. The whole of the nuclear cavity is filled with unstained linin strands, granular in appearance. These strands gradually merge on to the nucleolus on all its sides. With the onset of prophase the nucleolus gives out chromatin buds of various sizes from its sides. These buds vary from a minute globule-like structure to a big one almost of the size of the nucleolus itself. Generally one bud is seen to be cut off from the nucleolus at a time but more than one are sometimes noticed. These buds after their separation move towards the periphery of the nuclear cavity. Afterwards they are fragmented into smaller and smaller ones till they become granules and evenly distributed throughout the cavity. With the fragmentation and disintegration of these chromatin droplets the leptotene threads gradually emerge out.

As the buds are cut off, the nucleolus is seen to be vacuolate. This is the general phenomenon found in *Nymphaea lotus*, *N. rubra* and *N. Sulfurea*. Amongst these species, the nucleolus cuts off buds much more frequently in *Nymphaea Sulfurea*, so much so, that even after the organisation of the leptotene thread and in the synizetic stage, sometimes one or two buds are observed to lie entangled in the knot, but later on these buds also get dissolved. It is also observed that buds are bigger in size and shape in this species. In *Victoria regia* the nucleolus in the prophase stage gives out buds of very small size; mostly one bud is seen to be separated from the nucleolus at a time. Along with the formation of the threads, one

of them is seen attached to the nucleolus and chromatin flow takes place through it until the leptonema stage is properly organised. In the synizetic stage the nucleolus, while still attached to this spireme, get flattened and crescent-shaped as in *Lathyrus odoratus* (3) due to the continual flow of chromatin from it. But the earlier behaviour of the nucleolus in all the species studied is the same.

Miss Digby (2) was the first to show the nucleolar budding in *Primula Kewensis* and its related hybrids. While studying meiosis of *Hibiscus mutabilis* we (4) showed chromatin budding from the nucleolus and discussed the relevant literature and came to the conclusion that the function of the nucleolus, at least in this species, is to contribute chromatin to the developing spireme by budding. Recently Bose (1) observed in the pollen mother cells of *Argemone mexicana* the same nucleolar phenomenon and supported the "Chromatin theories" of the nucleolus.

From these observations, we confirm our previous opinion that the nucleolus is an important organ of the cell and contributes chromatin to the developing spireme by budding.

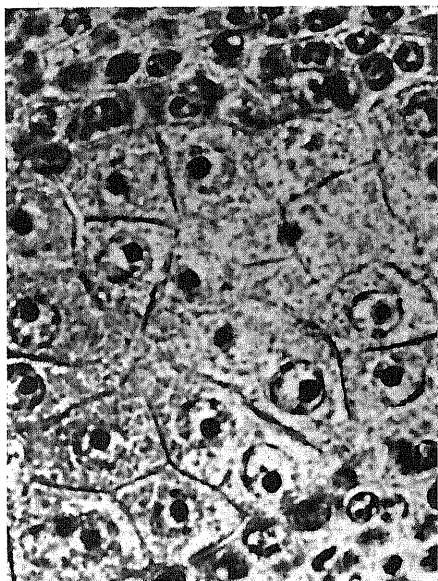
References

1. Bose, P. K. Cytological studies of *Argemone mexicana* Linn. 1937 (In the press).
2. Digby, L. The cytology of *Primula Kewensis* and of other related *Primula* hybrids. Ann. Bot. 26: 357-388, 1912.
3. Latter, J. The pollen development of *Lathyrus odoratus*. Ann. Bot. 40: 277-314, 1926.
4. Majumdar, G. P. and Datta, R. M. The role of the nucleolus in the formation of spireme in the pollen mother cells of *Hibiscus mutabilis* Linn. Cytologia, 6: 320-328, 1935.

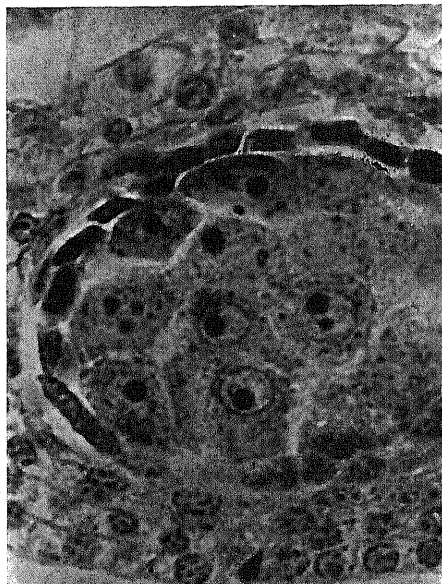
Explanation of Plate 11

Photomicrographs of pollen mother cells showing nucleolar budding in various stages. $\times 690$.

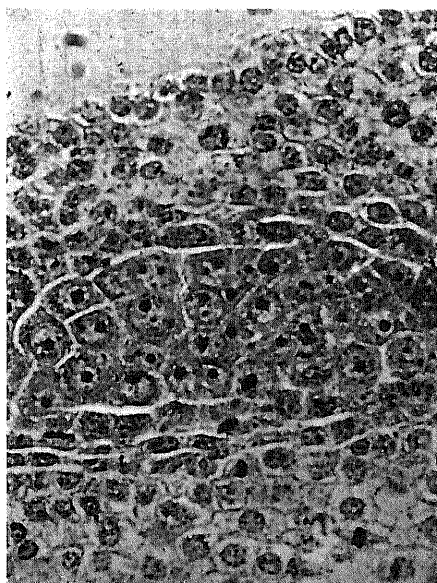
1. *Victoria regia*.
 2. *Nymphaea lotus*.
 3. *N. rubra*.
 4. *N. Sulfurea*.
-



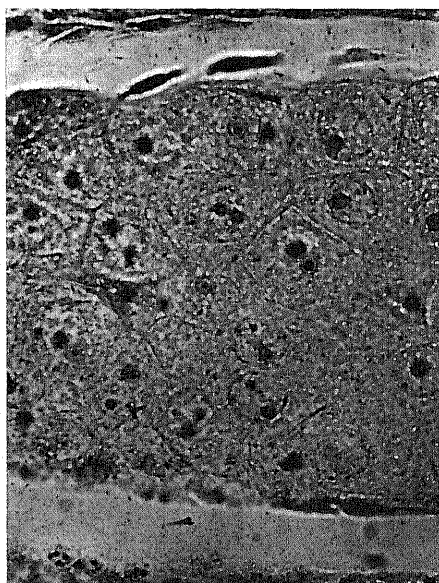
1



2



3



4

Majumdar and Datta: The behaviour of the nucleolus in the pollen mother cells of certain members of *Nymphaeaceae*

On the Vital Staining of the Cytoplasmic Granules

By

Jun-ichi Morita

Osaka-Kôtôgakkô, Osaka, Japan

Introduction

It is generally known that the cytoplasmic granules, which are stained by basic dye, are not only preexistent, as formerly believed exclusively (FISCHEL, 1901; ARNOLD, 1914; HERZFELD, 1917; MÖLLENDORF, 1918; PARAT, 1928; TANAKA, 1932; GUTSTEIN, 1933), but also can be formed anew, like the granules produced by acidic dye, out of the hyaline matrix by the desolvation of the colloidal particles (MÖLLENDORF, 1924; CHLOPIN, 1927; NAGEL, 1927; KRUKOWA, 1929; SALKIND, 1929; NASSONOV, 1930; WEINER, 1930; BEAMS and GOLDSMITH, 1930; USCHIN, 1931; LEBER, 1931; ALEXANDROV, 1932; GICKLHORN, 1932; KEDROWSKI, 1935). Here the process of the new formation of the vitally stained granules is to be divided into two independent processes. First, there is the formation of the granules by desolvation, and, second, the colouring of the formed granules. KEDROWSKI rightly pointed this out in his study of the red blood corpuscles of the frog (1935). He produced the desolvation granules by several anions. I shall present, below, a small experiment pointing to the independence of the two processes, producing the desolvation through an increase in acidity. The reversibility of the desolvation granules by a decrease in acidity will also be touched upon.

Materials and Methods

Eggs of sea urchins [*Strongylocentrotus pulcherrimus* (A. AGASSIZ), *Toxopneustes pileolus* (LAMARCK) and *Mespilia globulus* (A. AGASSIZ)] caught during the winter at The Seto Marine Biological Station have generally great vacuoles (Fig. 1). The vacuole is exudate of the matrix of the cytoplasm from the egg containing hardly any trace of granules, except some few occasionally. Hence, it may be regarded as the typical protoplasm. I shall call the granules which exist from the beginning in the vacuole the primary granules, distinguishing them from the secondary granules which are formed anew. The hyaline vacuole, which contains occasionally a few primary

granules, was used for the experiment. The epidermis cell of *Rhizophysa*, a planktonic *Siphonophora*, was used as reference material.

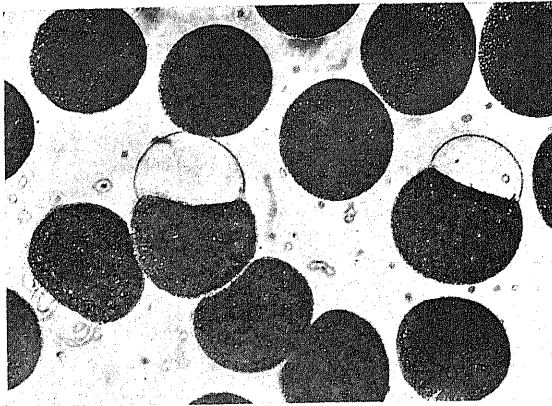


Fig. 1. Two hyaline vacuoles exudated from the eggs of *Strongylocentrotus pulcherrimus* (A. AGASSIZ).

The materials were stained beforehand in a finger ball or stained at the time under a cover glass.

The principle of the experiment consists in the utilization of the great velocity of evaporation and penetration of acetic acid and of ammonia into the water and into the cell and vacuole. The details

are as follows (Fig. 2). Under a cover glass (Cg), which is put upon the moist chamber (Mc) containing ca. 3 c.c. of water, is suspended a small drop of water containing the sea urchin eggs (Hd). A small quantity of appropriately diluted (reagent 1: distilled water 5-20) glacial acetic acid is introduced by a pipette (P) into the water of the moist chamber. The acetic acid evaporates and penetrates into the hanging drop to enter next into the cell and vacuole. The same applies to ammonia, only the action is reversed. Acetic acid acts as the desolvation agent, while ammonia acts as the solvator.

Methylen blue, Nile blue sulphate and Brilliant cresyl blue were used as the granule stainers. They were always administered before the acetic treatment.

An objective lens, Immers. 2 mm n.A. 1.4 ZEISS make, was used and in some cases a 1/12 fluorite ZEISS lens.

Ocular pieces of ZEISS k 2, k 6, k 8, k 12 and k 18 were attached.

Special care was taken to keep the cover glass quite clean. It was always neutral or somewhat alkaline, to avoid acidity.

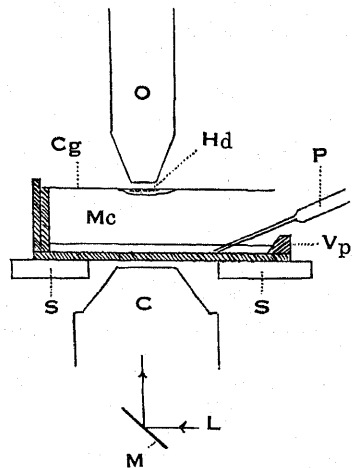


Fig. 2. Microscope equipped with moist chamber. C. Condensor, Cg. Cover glass, Hd. Hanging drop, L. Light, M. Mirror, Mc. Moist chamber, O. Objective lens, P. Pipette, S. Stage, Vp. Vaseline-paraffin.

Observations

I. First of all, I confirmed the following three points. a). The vacuole does not usually produces any new desolvation granules (secondary granules) during the first twenty to thirty minutes, if stained only with a vital dye. Occasionally however, one or sometimes several secondary granules are produced. Twenty to thirty minutes under the experimental condition (i.e. under the cover glass placed upon the moist chamber and lighted artificially through the microscopic condensor) are ample time, because, in the meantime, the structure of the nucleus already shows some appreciable change i.e. the intensification of a cloudy structure of the chromatin which was hitherto inconspicuous. b). The desolvation granules are easily produced without a vital dye in the heretofore hyaline vacuole by the introduction of acetic acid into the moist chamber. c). *Adopting Methyl red as the acidity indicator*, I ascertained that the penetration of the acetic acid into the vacuole and therefore the increase in cH is the cause of the formation of the desolvation granules.

Procedure:—The vacuole is stained vitally yellowish with Methyl red. One pipette of a one tenth dilution of the acetic acid poured into the moist chamber is enough to produce the desolvation granules in a few minutes and at the same time to change the colour of the vacuole to pink. The granules thus formed are equal in colouration to the surrounding fluid in the interior of the vacuole, as the Methyl red is not a granule stainer.

Thus the desolvation granules are not formed by the vital dye, but formed simply through the increase in cH, regardless of the presence of the dye.

II. I stained the vacuole with either Methylen blue, Nile blue sulphate or Brilliant cresyl blue, which are all good granule stainers. The vacuole was then treated with acetic acid vapour, as mentioned in the paragraph describing the method. Summarizing many experiments of the sort, I can state that, in a few minutes after the acetic acid was put into the moist chamber, there came into sight the desolvation granules deeply stained, and the tint of the surrounding fluid in the vacuole became faint. The appearance and colouring of the granules seem at first sight to be simultaneous phenomena. But, judging from many experiments of this sort (see exper. on page 326), it must be inferred that the appearance of the granules happens first and their colouring second. For this inference the following model experiment affords strong support.

Experiment:—Albumine colloid is tinted blue with methylen blue in a test tube. One drop of concentrated nitric acid, hydrochloric acid or sulphuric acid poured into the test tube produces immediately a precipitation. *The precipitation is white at first and soon becomes blue, taking up dye in the test tube.*

The smallness of the diameter of the desolvation granules in the vacuole and the fact that they are not so close as in the case of the precipitation in the test tube must have failed in most cases to separate the two processes chronographically.

III. May it not be possible to cause by the use of ammonia the disappearance of the desolvation granules produced by acid? Many experiments were repeated and are summarized as follows. It is difficult to some extent to cause the primary granules to disappear, while secondary granules easily disappear if ammonia is applied sufficiently early i.e. soon after the granules begin to appear. *Sometimes the granules disappear even when they are coloured deep with Nile blue sulphate.* It is not so much difficult to cause the granules to reappear after having once disappeared. But I have never succeeded in causing the desolvation granules to disappear a second time. Granules are thus only reversible so long as the desolvation process does not go too far.

I shall reproduce here a specimen paper of my notes. "A vacuole of the egg of *Toxopneustes pileolus* (LAMARCK) was stained with Methylen blue. Half a pipette of one tenth dilution of acetic acid was introduced into the moist chamber. After one minute and fifty five seconds from the introduction of the acid, granules of indistinct contour (secondary granules) begun to appear. Then one pipette of 1/10 dilution of ammonia was put into the moist chamber. The granules disappeared in a few seconds. The vacuole was blue in colour as before. I could not ascertain if the vanished granules had been coloured or not. *They seemed not to have been coloured.* Five minutes and twenty seconds from the first introduction of the acetic acid, was introduced once more one pipette of 1/10 dilution of acetic acid into the moist chamber. In one minute, fifteen to twenty granules appeared. Then, two pipettes of 1/10 dilution of ammonia were again used. But the desolvation granules after their second appearance could not be made to disappear again. They were already irreversible. The pH of the hanging drop was above 8 at the end of the experiment. The inside of the vacuole ought also be alkaline, yet the granules did not disappear."

I shall add another observation on the reversibility of the granules. A *Rhizophysa* was vitally stained in toto with Nile blue sulphate in a finger ball. The epidermis cell of the tentacle of the animal was examined with an ordinary cover-slide equipment. Several small blue tinted granules were displaying an active Brownian movement. They disappeared after eight to ten minutes, not simultaneously, but one by one. *The disappearance was quite sudden and complete, leaving not a trace.* They must have appeared by the desolvation and disappeared through solvation.

Remarks

It is probable that vital dyes, when taken into the cell, may cause, as a stranger to the cell, a certain condition which leads the colloid

ampholytes to approach their IEP and to desolvatate themselves. But the formation of the granules must not be regarded as the necessary consequence of the administration of the dye. The granule formation may take place or may not. It depends chiefly on the toxicity and the quantity of the dye given. There may be many factors to lead to the formation of the granules (e.g. the anions of KEDROWSKI), but the increase of the cH in the cell must be an important factor. Any granule stainer is taken up by the granules thus formed [YAMASAKI, 1934, identified the granules stained with an acidic dye (Trypan blue) to those stained with a basic dye (Neutral red)].

The process of colouring may be chemical (LEBER, 1931) or adsorptive. This can not be decided at present. But, if it were chemical, there ought not be so great a chemical change because *the granules once coloured are also reversible like the granules not coloured*. The reversible colouring of the vacuole and cell membrane of the plant cell according to the cH of the medium (STRUGGER, 1936) lends colour to this view.

Conclusions

1). The formation of the vitally stained granules is separable in two independent processes. First there is the desolvatation of the colloid particles by the increase of cH or for other reasons, and, secondly, the colouration of the formed granules. 2). The granules are reversible even when they are coloured. They are formed by desolvatation through the increase of cH and made to disappear by solvatation through the decrease of cH.

Bibliography

- Alexandrov, W. Protoplasma 17: 161, 1932.
 Arnold, J. Über Plasmastrukturen und ihre funktionelle Bedeutung. Jena, G. Fischer 1914.
 Bank, O. Protoplasma 25: 188, 1936.
 Beams, H. and Goldsmith, J. Journ. of Morph. and Physiol. 50: 497, 1930.
 Chlopin, N. Arch. f. exper. Zellf. 4: 462, 1927.
 Fischel, A. Anat. H. 16: 415, 1901.
 Gicklhorn, J. Ergebn. d. Biol. 7: 549, 1931.
 Gutstein, M. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 82: 479, 1932.
 Herzfeld, E. Anat. H. 54: 447, 1917.
 Karczag, L. Arch. f. exp. Zellf. 6: 332, 1928.
 Kedrowski, B. Protoplasma 22: 44, 1935.
 Krujukowa, Z. Arch. Russes d'Anat., d'Histol., et d'Embryol. 8: 101, 1929.
 Leber, Wa. Zeitschr. f. Zellf. 14: 566, 1931.
 Lison, L. Protoplasma 24: 453, 1935.
 Möllendorf, W. v. Arch. f. mikr. Anat. 90: 463, 1918.
 ——— Oppenheimers Handb. f. Biochem. 2. Aufl. 1924.

- Nagel, A. Zeitschr. f. Zellf. 9: 346, 1927.
Nassonov, D. Zeitschr. f. Zellf. 11: 179, 1930.
Parat, M. Arch. d'Anat. microsc. 24: 74, 1928.
Pfeiffer, H. Protoplasma 8: 261, 1930.
Salkind, S. Zeitschr. f. Zellf. 10: 253, 1929.
Semenoff, W. E. Zeitschr. f. Zellf. 20: 779, 1934.
Strugger, S. Protoplasma 26: 56, 1936.
Tanaka, H. Arch. f. exper. Zellf. 13: 47, 1932.
Uschin, N. P. Arch. f. exper. Zellf. 11: 472, 1931.
Wallbach, G. Protoplasma 17: 108, 1932.
Weiner. Zeitschr. f. mikr. anat. Forsch. 20: 122, 1930.
Yamasaki, M. Arb. a. d. anat. Inst. d. Kaiserl.-Jap. Univ. zu Sendai, Tôhoku 16: 1934.
-

Über Kapsel- und Samenbildung bei *Lilium candidum*

Von

B. Němec (Praha)

Seit mehreren Jahren beschäftige ich mich mit Fragen über die Befruchtung, Kapsel- und Samenbildung bei *Lilium candidum*. Die bisherigen Angaben lauten recht widersprechend. Eines ist sicher, daß nämlich bei der typischen, als Zierpflanze kultivierten Lilie Kapseln und Samen selten gebildet werden. Als ich die von CONRAD GESSNER i.J. 1577 ausgeführten Versuche mit abgeschnittenen Stengeln wiederholte und die Narben mit eigenem Pollen bestäubte, erhielt ich nur ein einzigesmal Kapseln und Samen. Bei näherer Untersuchung zeigte es sich, daß der eigene Pollen bei den meisten Individuen an der Narbe gar nicht keimt, daher auch keine Befruchtung stattfindet. Das hat mich auf den Gedanken gebracht, die Narbe bei der Befruchtung mit einer Zuckerlösung zu befeuchten, weil dann die Pollenkörner keimen und eine Befruchtung herbeiführen könnten. Der Versuch ist tatsächlich gelungen und es gelang so keimfähige Samen nach Befruchtung mit eigenem Pollen sicher zu erzielen (NĚMEC, Über Frucht- und Samenansatz bei *Lilium candidum* L. Praha 1935). Dabei wurden jedoch auch Pflanzen gefunden, welche nach Bestäubung mit eigenem Pollen auch ohne Befeuchtung der Narbe mit Zuckerlösung Kapseln und Samen bilden. Allerdings waren solche Pflanzen selten.

Weitere Versuche zeigten, daß es verschiedene Formen der weißen Lilie gibt, welche sich in Bezug auf die Bestäubung und Samenbildung verschieden verhalten. Es ist ja auch sonst bekannt, daß im Grade der Selbststerilität alle Übergränge vorkommen (LEHMANN, Selbststerilität, Heterostylie, Berlin 1928).

Da für *Cytisus laburnum* und einige *Corydalis*-Arten bewiesen wurde, daß sich ihre Selbststerilität abschaffen läßt, da bei diesen Pflanzen Befruchtung erzielt wird, wenn der Pollen eigener Blüten auf der Narbe verrieben wird, habe ich bei *Lilium candidum* Versuche angestellt, ob sich nicht eine Befruchtung erzielen ließe, wenn die Narben vor der Bestäubung durch Kratzen oder Feilen verwundet wären. Dieses Verfahren führte tatsächlich zum Ziele und ersetzte in den meisten Fällen die Zuckerlösung. Die Rasse, welche früher an abgeschnittenen Stengeln nach Befeuchten der Narben und Be-

stäubung mit eigenem Pollen Kapseln bildete, ohne Zuckerlösung jedoch selbststeril zu sein schien, bildete schöne Kapseln und Samen, wenn ihre Narben vor der Bestäubung angekratzt oder mit einer feinen Stahlfeile verwundet wurden. Wenn der Blütenstand in Verbindung mit der Zwiebel belassen wurde und die Narben ähnlich behandelt wurden, kam es zu einer Befruchtung, die Fruchtknoten richteten sich auf, begannen anzuschwellen, stellten jedoch später ihr Wachstum ein, vergilbten, verwelkten und vertrockneten. Bei einer anderen Rasse kam es an Stengeln, welche in Verbindung mit den Zwiebeln blieben und deren Narben vor der Bestäubung gekratzt oder mit einer Zuckerlösung befeuchtet wurden, wahrscheinlich überhaupt nicht zur Befruchtung, da sich die Fruchtknoten nicht aufwärts richteten und früh abstarben, ohne anzuschwellen.

Am überraschendsten war für mich eine Rasse, welche nach Bestäubung mit eigenem Pollen auch an Stengeln, welche in Verbindung mit ihren Zwiebeln verblieben, ohne weitere Behandlung der Narbe reife, samenhaltige Kapseln bildet. Diese Rasse wird in Lety bei Prag kultiviert und ist vielleicht mit der in England gezogenen Varietät Salonika, auf welche mich Dr. TINCER freundlichst aufmerksam gemacht hat, verwandt.

Bei anderen Rassen entstehen an abgeschnittenen Stengeln, welche in Wasser standen, in den Blattachsen Zwiebelchen, welche Würzelchen trieben und später abfielen. Sie erschienen nicht nur an Stengeln mit unbefruchteten Fruchtknoten, sondern auch an solchen, welche eine oder zwei Kapseln und keimfähige Samen entwickelten. An Stengeln, welche in Verbindung mit ihrer Zwiebel belassen wurden, erschienen bei dieser Rasse solche Zwiebelchen (Bulbillen) nicht.

Aber es gibt eine merkwürdige Rasse, welche dadurch ausgezeichnet ist, daß die Stengel zahlreiche achselständige Zwiebelchen bilden, auch wenn sie in Verbindung mit der Zwiebel bleiben. Nach Bestäubung mit eigenem Pollen bildeten diese Pflanzen keine Samen.

Meist vermehrt sich die weiße Lilie nicht durch Samen, sondern durch achselständige, in ihrer Zwiebel entstehende Nebenzwiebeln. Daher besteht das kultivierte *Lilium* meist aus sich vegetativ vermehrenden Klonen, welche dabei offenbar ihre Eigenschaften zäh behalten. Diese Klone unterscheiden sich von einander nicht nur morphologisch, sondern auch in der Art ihrer Vermehrung, insbesondere was ihre Befruchtungsverhältnisse betrifft. Die Blüteneinrichtung der weißen Lilie weist auf eine Fremdbestäubung hin. Aber wie wir gesehen haben, gibt es Rassen, welche gut selbstfertil sind und zwar auch wenn ihre Blütenstände in Verbindung mit der Zwiebel verbleiben.

Die Rassen, welche ich bei *Lilium candidum* bisher beobachten und unterscheiden konnte, lassen sich in nachfolgende Gruppen einteilen:

I. Formen, welche Kapseln und Samen auch dann bilden, wenn ihr Blütenstand in Verbindung mit der Zwiebel verbleibt.

1. Kapseln und Samen entstehen auch nach autogamer Bestäubung ohne Befeuchtung der Narbe mit einer Zuckerlösung.
2. Kapseln und Samen entstehen nur nach allogamer Befruchtung ohne Befeuchtung der Narbe.

II. Rassen, welche Kapseln und Samen bilden, nur wenn die Blütenstände abgeschnitten und in Wasser gestellt werden.

A. An den abgeschnittenen Stengeln entstehen keine achselständigen Zwiebelchen.

1. Kapseln und Samen entstehen nach autogamer Bestäubung ohne weitere Behandlung der Narbe.
2. Kapseln und Samen entstehen nach autogamer Bestäubung nur wenn die Narben angekratzt oder mit einer Zuckerlösung befeuchtet werden.

B. Rassen, welche an den abgeschnittenen Stengeln zahlreiche achselständige Zwiebelchen bilden, an unversehrten Pflanzen jedoch keine.

1. Früchte und Samen entstehen auch nach autogamer Bestäubung ohne weitere Behandlung der Narbe.
2. Früchte und Samen entstehen nach autogamer Bestäubung, nur nachdem die Narbe angekratzt oder mit Zuckerlösung betupft wurde.

Bei diesen beiden letzten Rassen tritt Befruchtung auch dann ein, wenn die Blütenstände in Verbindung mit der Zwiebel bleiben. Das ergibt sich äußerlich daraus, daß sich die Fruchtknoten geotropisch aufrichten und anzuschwellen beginnen. Sie wuchsen z.B., wenn die Bestäubung Ende Juni stattfand, bis Mitte August, begannen dann jedoch zu vergilben und vertrockneten. In keinem einzigen Fall gelang es mir an ihnen eine Reifung der Kapsel zu beobachten.

C. An den Stengeln entstehen zahlreiche achselständige Zwiebelchen, auch wenn die Blütenstände in Verbindung mit der Zwiebel bleiben. Die Blüten dieser Rasse waren normal, sie bildeten nach Bestäubung mit eigenem Pollen keine Samen. Diese Rasse besaß ich schon vor mehreren Jahren, wo ich noch nicht die Methode kannte die Narbe anzukratzen oder mit einer Zuckerlösung zu befeuchten. Auch wurden mit dieser Rasse keine Versuche über den Einfluß des Abschneidens der Blüten-

stände angestellt. Die Zwiebelchen erschienen erst nach dem Abblühen der Pflanzen.

In allen Versuchen mit abgeschnittenen Stengeln reiften höchstens nur zwei Kapseln an einem Stengel, auch wenn deren viel mehr befruchtet wurden und anzuschwellen begannen. Man beobachtet häufig, daß sich am Stengel von den heranwachsenden Kapseln nach unten grüne, lebendige Streifen ziehen, wogegen die übrigen Sektoren schon vergilbt oder abgestorben sind. An Stengeln, welche fähig sind in Verbindung mit der Zwiebel Kapseln zu bilden, reifen deren vier bis fünf.

Inwieferne diese Rassen auch bei Vermehrung durch Samen beständig sind, kann jetzt noch nicht gesagt werden. Auch zytologische Untersuchungen über einzelne Rassen sind erst im Gange.

Appearance of Brown Mutants in X-ray Progenies of *Homoeogryllus japonicus* de Haan

By

Kazuo Suzuki

Botanical Institute, Faculty of Agriculture,
Tokyo Imperial University

In the course of breeding experiments with *Homoeogryllus japonicus* which normally has a lustrous black body colour, a light brown coloured mutant first made its appearance in 1934 in F₁ progeny of X-rayed parents (Table 1). The procedure of the X-ray treatment of the parents was as follows: Coolidge tube with tungsten anticathode, kilovolts 70, milliamperes 3, distance from the anticathode 30 cm., aluminium filter 1 mm. thick, length of the exposure 7 minutes. The experimental materials as exposed to the X-rays were both female and male insects while still in their larval stage.

As seen in this table, out of 469 F₁ progeny only one brown mutant was obtained, besides which one gynandromorph appeared also.

Table 1

1933 P		1934 F ₁				
Number of X ♀	Number of X ♂	N ♀	N ♂	b ♂	g	Total
6	8	214	253	1	1	469

N.B. X ♀ - X-rayed female, X ♂ - X-rayed male, N ♀ - normal black female, N ♂ - normal black male, b ♂ - brown male, g - gynandromorph.

In order to analyse the genetic behaviour of this new brown character, breeding experiments have been carried out during the last three years.

The brown male which appeared first in 1934 was caused to mate with three normal virgin females which were the progeny of non-X-rayed parents. Soon after the crossing each female was separated from the others and kept to lay eggs. In the following year three pedigree cultures, designated No. A, No. B, No. C, were obtained

Table 2

Pedigree No.	1934P		1935F ₁		Total
	♀	♂	N ♀	N ♂	
A	N ♀	b ♂	94	129	223
B	N ♀	b ♂	15	11	26
C	N ♀	b ♂	14	21	35
Total			123	161	284

in which a total of 284 F₁ insects were reared in all (Table 2). These F₁ progeny comprising 123 females and 161 males were all normal and black in their body colour.

In the F₂ generations of these crosses the alleles, black

and brown, were segregated in a simple Mendelian ratio, i.e., in the proportion of about 3:1 which is shown in Table 3. The brown character was thus proved to behave as recessive to the normal

Table 3

Pedigree No.	1936F ₂				Total
	N ♀	N ♂	b ♀	b ♂	
A	256	129	—	123	508
B	72	48	—	38	158
C	134	89	—	66	289
Total	462	266	—	227	955
	728				

character, black. The F₂ brown insects were all males and their number was nearly equal to that of the normal coloured males.

In 1936, the F₂ females were crossed with the F₂ males. In the case of crossings between the F₂ females and the black F₂ males, there

appeared black females, black males and brown males in a proportion of approximately 3:2:1 (cf. Table 4). In another case of crossings of the F₂ females and the brown F₂ males, four classes of segregants were obtained in a ratio of about 2:2:1:1 (cf. Table 4).

These results may be explained by considering the F₂ females, though they were all phenotypically black, to be a mixture of homo- and heterozygotes with respect to the alleles concerned.

Table 4

F ₂	1936F ₃				Total
	N ♀	N ♂	b ♀	b ♂	
N ♀ × N ♂	144	108	0	57	309
N ♀ × b ♂	92	115	53	50	310

Ohmachi (1927), in his preliminary note, showed that spermatogonial chromosomes of normal *H. japonicus* consisted of twenty rods and one long rod-shaped X-chromosome, making twenty-one in all; this observation being recently confirmed by the writer (1934).

The spermatogonial chromosomes of the brown mutants were examined (Fig. 1), their number and form being quite similar to those of the chromosomes found in normal insects.

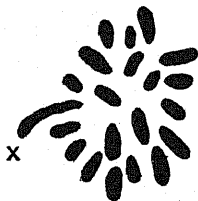


Fig. 1. Spermatogonial chromosomes of a brown mutant of *Homoeogryllus japonicus*. ×2300.

In his genetical studies on a male intersexuality of this species, Ohmachi (1932, 1935) was led to believe that the production of male intersexuality is due to a mutant gene appearing in the X-chromosome which is single in the digametic male. Considering the results of the present experiments with the brown insects carried out in four generations and also the fact that the chromosomes found in

the brown insects did not show any perceptible difference in their number, form, and behaviour from those of the normal ones, it may

possibly be concluded that the appearance of the brown character is due to a mutant recessive gene occurring in an X-chromosome which exists in the digametic male sex, as believed by Ohmachi in the case of male intersexuality. And it may be reasonably surmised that the mutant recessive gene in the present case was produced by some effects of the X-rays in an X-chromosome.

Literature

- Ohmachi, F. 1927. Preliminary note on cytological studies on Grylloidea. Proc. Imp. Acad. (Tokyo), 3.
— 1932. Preliminary note on breeding experiments with male intersexes in *Homoeogryllus japonicus* de Haan. ib., 8.
— 1935. Studies on male intersexuality in *Homoeogryllus japonicus* de Haan I. Breeding experiments and genetical analysis. Zeits. ind. Abst. u. Vererb., 68.
Suzuki, K. 1934. Gynandromorphs in *Homoeogryllus japonicus* de Haan. Proc. Imp. Acad. (Tokyo), 10.
-

Reciprocal Chromosome Translocations Without Semi-sterility

By

Walter P. Thompson and Mary G. Thompson

University of Saskatchewan, Canada

Semi-sterility is a characteristic of plants which are heterozygous for a reciprocal translocation of chromosome segments. This is due in most cases to the death of those gametes (50 per cent in all) which receive chromosomes occupying adjacent positions in the translocation ring. Such gametes are inviable because any two adjacent chromosomes must include a normal and an interchange one and such a pair will lack a portion of one original chromosome and will have a portion of the other duplicated (see diagram 1). On the other hand gametes which receive alternate chromosomes (50 per cent) must contain all the original chromatin unduplicated, either in the original arrangement or the new, and will therefore be fully viable. Thus "adjacent" segregation of the 4 chromosomes in the ring produces inviable gametes and "alternate" segregation produces viable ones.

In those naturally occurring types of *Oenothera* in which large translocation circles appear, the segregation is regularly of the alternate type, as was shown originally by Cleland and subsequently by many other authors. Such forms of *Oenothera* therefore possess a mechanism which prevents this type of semi-sterility. The inviable gametes in that genus are due to special lethal mutations. Catcheside (1935) has produced reciprocal translocations artificially in a segregate of *O. Lamarckiana* (*blandina*) which normally has no rings but only pairs of chromosomes, and has shown that the segregation of the artificially produced rings, like that of the naturally occurring ones, is alternate (zigzag). The genus appears, therefore, to have a natural mechanism which ensures alternate segregation and avoids semi-sterility of the usual type (not due to special lethals).

The purpose of the present paper is to show that alternate segregation and consequent lack of sterility appears to be the rule in experimentally produced reciprocal translocations in wheat. An essential feature of the *Oenothera* situation therefore exists in *Triticum*.

A number of reciprocal translocations were produced in different species of wheat by radiation treatment. The most convenient method consisted of placing a glass tube of radon of approximately 25

millicuries in the centre of a mass of 300 germinating grains and leaving it for 5 hours. A proportion of the resulting plants showed several kinds of chromosome alterations. Since a particular alteration is usually confined to 1 stem and spike on the treated plant, and since convenience of cytological preparation requires a whole spike, the translocations which have been studied were identified in the second generation after treatment, in which all spikes of each plant have the same chromosomal constitution.

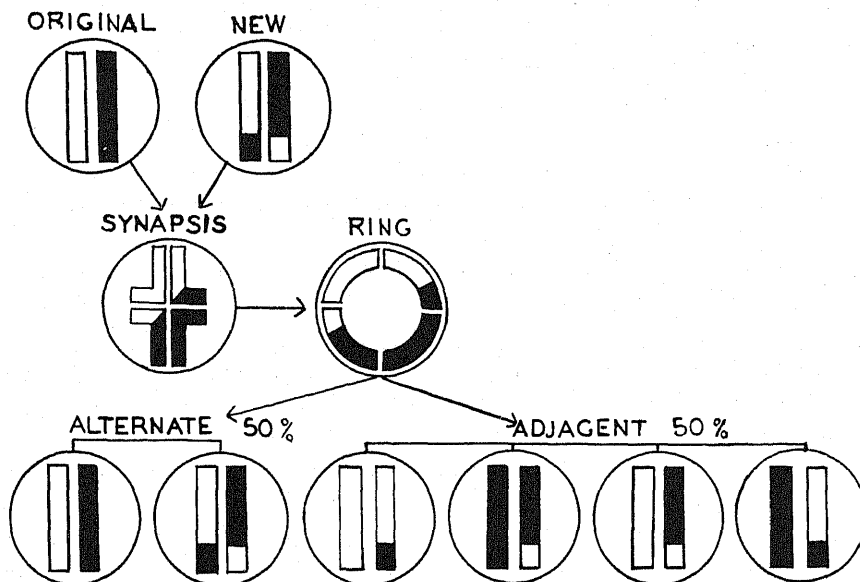
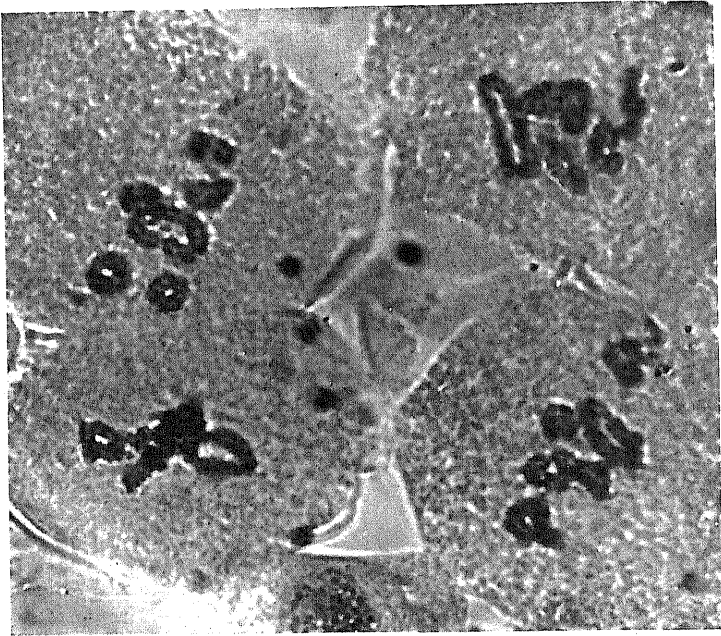


Diagram 1. The usual behaviour of the chromosomes in a reciprocal translocation as described by several authors for *Zea* and other plants.

An examination of the remaining spikes of the first plant in which a translocation was found in *Triticum monococcum* gave the unexpected result that fertility appeared to be nearly normal. Other cases as they were discovered gave a similar result. A careful study was therefore made of the chromosome configurations and the sterility (both seed and pollen) in heterozygous plants and their normal sisters in the second, third and fourth generations after treatment (R_2 , R_3 , R_4). Five different translocations have been studied. Three of them were in *T. monococcum* which normally has seven pairs of chromosomes and 2 in *T. durum* which normally has 14 pairs.

In all 5 cases the complex of 4 chromosomes, 2 original and 2 interchange, presents the usual appearance at diakinesis and often at early metaphase. Text-fig. 1 shows 4 adjacent pollen mother cells of an aceto-carmin preparation from an R_4 plant of translocation 1

in *T. monococcum*. In all 4 cells the large translocation ring may easily be seen, and in three of them the remaining 5 bivalents may



Text fig. 1. Photomicrograph of 4 adjacent pollen mother cells of *T. monococcum*, translocation 1. The large ring is visible in all 4 and the 5 bivalents may be counted in 3 of them. $\times 1600$.

be counted. Clearly 2 of the normal 7 bivalents are associated in the ring. Text fig. 2 is a drawing of an aceto-carmin preparation of translocation 2 of *T. monococcum*. It shows the ring of 4 and the 5 bivalents. At later metaphase the complex does not usually present the appearance of a simple ring; this will be described later.

Pollen mother cells from plants which are heterozygous for each of the other 3 translocations show essentially the same conditions. At earlier prophase stages the complex takes the usual form of a cross.

Approximately half the progeny of a plant with rings also show rings; the other half are normal.

In spite of the presence of the reciprocal translocation in the heterozygous condition, the fertility in all cases was nearly normal. This is shown in Table 1. The letter m in a translocation number means that it occurred in *monococcum*; the letter d means *durum*. A + sign under "Ring of 4 chromosomes" means presence; - means absence; consequently a + plant is heterozygous for the translocation and a - plant is homozygous normal or interchange. All plants in each section of the table are daughters of a single R_3 plant and were grown in the same row. In collecting the data on seed sterility

in *T. monococcum*, which normally sets only 1 seed per spikelet, the total number and the number of empty spikelets in the central part

Table 1. Percentage of seed and pollen sterility in fourth generation plants heterozygous for a translocation and in their normal sibs, all grown in 1936

Translocation number	Plant number	Ring of 4 chromosomes	Per cent sterile ovaries.	Per cent bad pollen
m 1	1114	+	7.2	7.7
	1117	+	2.0	7.1
	1111	—	1.6	1.1
	1115	—	1.1	4.5
	1116	—	2.4	1.6
m 1	1121	+	4.8	5.6
	1123	+	9.8	3.6
	1126	—	0.9	1.2
	11215	—	0.0	2.9
m 2	1418	+	6.4	14.2
	1419	+	8.8	8.6
	14110	+	5.2	14.4
	1412	—	0.0	1.59
	1415	—	1.6	5.5
m 2	1455	+	8.6	5.5
	1457	+	11.7	8.7
	1451	—	0.0	1.9
	1459	—	2.8	0.0
m 2	1472	+	2.9	5.0
	1471	—	3.6	2.3
m 3	3211	+	5.9	6.2
	3215	+	5.9	18.6
	3217	—	—	1.7
m 3	3276	+	3.2	15.6
	3271	—	0.0	8.6
	3272	—	1.9	3.8
m 3	3293	+	6.9	4.0
	32915	+	5.5	13.8
	3292	—	0.0	5.1
	3299	—	3.7	1.7
	32916	—	1.5	1.9
d 1	43110	+	5.1	7.2
	4314	—	0.0	1.3
	4316	—	2.4	1.4
d 1	4323	+	6.0	5.2
	4324	+	0.0	5.2
	4325	—	7.2	4.1
d 2	14211	+	—	9.6
	14212	+	7.5	6.5
	14214	+	4.1	2.1
	14218	+	3.6	17.4
	14232	—	3.3	1.4
	14233	—	0.0	4.2
	14234	—	0.0	7.1
	14236	—	4.1	0.5

only of the spike were recorded, because in normal plants seeds frequently fail to set at the top and bottom of a spike. For any one plant the total number of spikelets counted varied from 30 to 120. In *T. durum* only the two lower flowers of a spikelet were counted, because under poor conditions the upper flowers may not set seed. In collecting the data on pollen sterility at least 100 pollen grains and usually more than 300 were counted in aceto-carmin preparations.

It will be observed that the sterility, either male or female, in heterozygous (+) plants never approaches the expected 50 per cent, but on the other hand is usually between 5 and 10 per cent. Since the homozygous plants (normal or interchange) usually show from 1 to 3 per cent, and untreated plants show about the same percentage, it is clear that the plants which are heterozygous for the translocations show only slightly more sterility than normal. But they are consistently a little more sterile.

In table 2 are shown the percentages of sterile ovaries and pollen grains in all the plants examined for each translocation and for all translocations together.

Similar data are available for second and third generation plants.

The reason that plants with the translocations show so little sterility becomes evident when the segregation of the 4 chromosomes in the complex is studied. In the great majority of cases at late metaphase the complex is not a simple ring but a horizontal figure 8. This is illustrated in photomicrograph (text fig. 11) and in the drawings (text figs. 3 to 6). An early stage in the transformation of the ring into a zigzag structure is shown in text fig. 4, in which 1 chromosome

is moving over to take up a position alongside the opposite one in the ring. Text figs. 3, 5, and 6 illustrate the appearances commonly seen when the metaphase plate has been organized. The striking similarity to the zigzag arrangement familiar in the heterozygous species of *Oenothera* is evident. Often this zigzag arrangement may

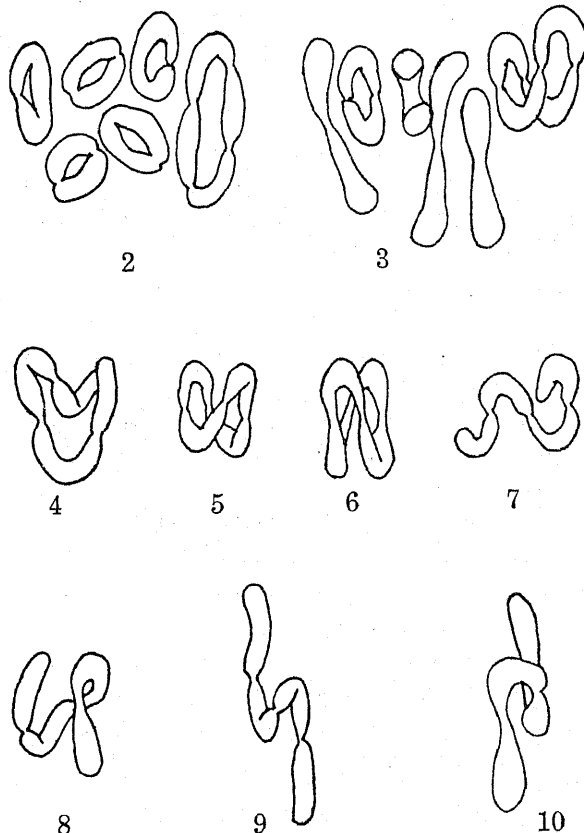
Table 2

Species	Translocation number	Rings present(+) or absent(-)	Per cent sterile ovaries	Per cent bad pollen
<i>Mono-coccum</i>	1	+ —	5.9 1.3	5.8 2.4
"	2	+ —	7.7 1.4	8.8 2.5
"	3	+ —	5.8 1.3	12.5 3.7
<i>Durum</i>	1	+ —	4.1 3.9	5.6 2.1
"	2	+ —	5.1 1.7	9.5 4.2
All		+ —	6.0 1.6	8.8 3.1

at first glance be mistaken for 2 bivalents lying in contact, but careful focussing readily shows the true situation. Clearly chromosomes which are adjacent will go to opposite poles. This becomes still more obvious at the stage at which the complex has broken at one point. The appearance at this time is illustrated in photomicrograph (text fig. 11) and text figs. 7 to 10.

Arrangements such as those illustrated are seen in the great majority of cases at metaphase and anaphase. Occasionally the simple ring is present at late metaphase and sometimes the appearance is such that adjacent chromosomes must go to the same pole. But the proportion of such cases is small.

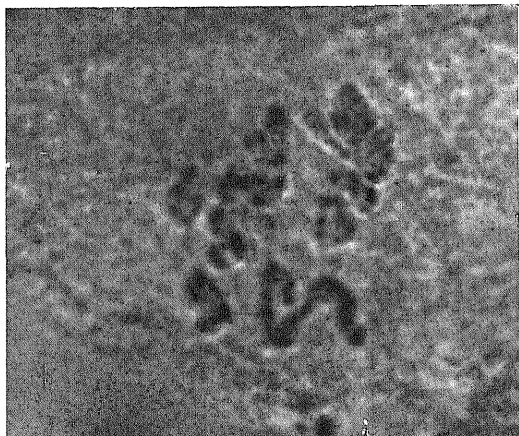
Since the chromosomes involved in the translocation alternate in the complex with those of the original type, and since alternate ones go to the same pole, it is clear that half the gametes will receive the 2 original chromosomes and half will receive the interchange ones. In either case all the original chromatin will be represented and none will be duplicated (see diagram 1). Consequently all the gametes produced will be viable. The fact that plants which are heterozygous for the translocation show slightly more seed and pollen sterility than their homozygous sisters is due



Text figs. 2-10. 2. Pollen mother cell showing the ring of 4 chromosomes and 5 bivalents. 3. Zigzag arrangement of the chromosomes in the translocation complex and 5 bivalents. 4. The ring becoming zigzag. 5 to 10. Different views of the translocation complex. All are from *T. monococcum* except 8 which is from *T. durum*. Aceto-carmin smears drawn at a magnification of 1600.

to the occasional absence of the zigzag arrangement, as described in the last paragraph.

Since the same situation with respect to fertility, associated with



Text fig. 11. Photomicrograph. *T. durum*, translocation 1. Below is the translocation complex broken at one place and showing the zigzag arrangement. $\times 1600$.

the same method of chromosome segregation, has been found in 5 independent translocations involving 2 species, the results may be regarded as typical for the genus *Triticum*.

Catcheside (1935) has shown that the same alternate disjunction occurs in artificial translocations in a form of *Oenothera* which normally has no translocations. Nevertheless in most of his cases the heterozygous plants were at least 50

per cent sterile and the translocation was not (or only rarely) transmitted to the next generation. He believes that this is due to lethal mutations which occurred at the same time as the translocations. The lethal affects all the pollen and most of the eggs which receive the interchange chromosomes. No indication of such lethals can be found in the data on fertility in the wheat translocations.

In any case it appears that both the genera *Triticum* and *Oenothera* have a natural mechanism which insures alternate disjunction from translocation complexes.

Summary

Three different reciprocal translocations produced by radiation treatment in *Triticum monococcum* and 2 in *T. durum* have been studied. A plant which is heterozygous for any of them shows nearly normal fertility, both of seeds and pollen. This is due to a regular zigzag (*Oenothera*-like) segregation of the 4 chromosomes in the translocation ring.

Literature Cited

- Catcheside, D. G. X-ray treatment of *Oenothera* chromosomes. *Genetica* 17: 313-342. 1935.

Untersuchung von Chromosomenabschnitten, die eine Aberration erlitten haben

Von

N. N. Sokolow

Aus dem Institut für experimentelle Biologie zu Moskau (Direktor—
Prof. Dr. N. K. Koltzoff) und dem Ukrainischen Institut
für experimentelle Medizin zu Charkow

In Zusammenhang mit allgemeinen Problemen des Mutationsprozesses, insbesondere in Zusammenhang mit der Frage nach dem Mechanismus der Chromosomenaberrationen, war es von Interesse, eine eingehende zytologische Untersuchung von Chromosomenabschnitten durchzuführen, in denen eine Chromosomenaberration stattgefunden hat.

Zur Untersuchung dieser Frage konnten die Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsenzellen von *Drosophila* herangezogen werden, denn in diesen Chromosomen lassen sich ja 1–2 Gene ergreifende Veränderungen erkennen, die zytologisch in Verlagerungen einer Scheibe, ja zuweilen auch nur eines Teiles einer Scheibe zum Ausdruck kommen (MULLER und PROKOFYEWA 1934, MACKENSEN 1935 u.a.).

In der gegebenen Arbeit wurden über 70 Chromosomenaberrationen bei *Drosophila melanogaster* untersucht. Es handelt sich meistens um reziproke Translokationen zwischen dem III. und IV. Chromosom, doch wurden auch andere Typen von Aberrationen untersucht.

Die meisten reziproken Translokationen zwischen dem III. und IV. Chromosom waren von N. W. DUBOWSKY und L. W. KELSTEIN (Charkow) erhalten worden und wurden uns von ihnen zur Verfügung gestellt, wofür der Verfasser ihnen innigst dankt.

Der zytologischen Analyse wurde die von BRIDGES (1935) zusammengestellte Karte zugrunde gelegt. In allen Fällen, mit nur sehr seltenen Ausnahmen, stellten unsere Beobachtungen Strukturen fest, die völlig mit BRIDGES' Abbildung übereinstimmten. Die Ausnahmen betrafen hauptsächlich allerdünnste Scheiben, wobei wir sie nicht mit Sicherheit feststellen konnten. Zuweilen hingegen wurden Scheiben gefunden, die auf der Karte fehlten.

In Zusammenhang mit diesem und ähnlichen Umständen kann die Frage nach einer gewissen Relativität der angewandten Methode

auftreten, doch werden Fehler in den Schlußfolgerungen im gegebenen Falle durch die vergleichende Analyse heterozygoter Strukturen beseitigt, wo als Kontrolle die Struktur des normalen Chromosoms dient, das bei denselben Färbungs-, Fixierungs- u.a. Bedingungen untersucht wird.

Zudem hatte eine bedeutende Zahl der Brüche in Gegenden zwischen oder in der Nähe scharf hervortretender Scheiben stattgefunden.

Die Brüche des IV. Chromosoms finden gewöhnlich, wie dies schon bekannt ist (PAINTER 1935; DUBININ, SOKOLOW u. TINIAKOW 1935), in einer recht begrenzten Region statt. Dabei sah das Bild des proximalen sich links von der Grenze 101 nach BRIDGES' Karte befindenden Abschnittes des IV. Chromosoms auf unseren Präparaten immer kompakt aus, dabei im Grunde genommen aus 3 Teilen bestehend (s. DUBININ, SOKOLOW u. TINIAKOW 1935). Praktisch verschmelzten sie zu einem sich dunkel färbenden Abschnitt. Gewöhnlich läßt sich dieser Abschnitt leicht im translozierten Chromosom finden, das ständig¹⁾ einen gewissen Teil dieses Abschnittes trägt.

Zur Illustration der Übereinstimmung unserer Beobachtungen über die Struktur der Chromosomen mit der Karte als auch des Charakters der Brüche des IV. Chromosoms seien hier heterozygote Translokationen III-IV angeführt (Abb. 1).

Hier muß bemerkt werden, daß auf den weiter unten an geführten Abbildungen genau nur die Struktur recht begrenzter Chromosomenabschnitte wiedergegeben wurde, die gewöhnlich bestimmten mit Buchstaben bezeichneten Abschnitten oder sogar Teilen solcher Abschnitte, bis zu einem charakteristischen Punkt in ihnen (einer Scheibe u. dgl.), der Karte BRIDGES' entsprechen. Die übrigen Abschnitte sind nur durch in die Augen fallende Scheiben vertreten und dienen zur Klärung der Lage des genau untersuchten Abschnittes im Chromosom. So z.B. ist auf der Abb. 9 (Einfügung aus dem IV. Chromosom ins III.) genau nur der Abschnitt 99 C, die übrigen Abschnitte hingegen nur in allgemeinen Zügen abgezeichnet.

Die Analyse unter dem Mikroskop ergriff aber gewöhnlich größere Abschnitte als die, deren Struktur genau auf den Abbildungen wiedergegeben ist.

Bevor wir zur Darlegung des Tatsachenmaterials übergehen, müssen noch einige Momente erörtert werden, die mit chromosomalen Verlagerungen verknüpft sind und wesentliche Bedeutung für unsere Betrachtungen haben.

1) Die Aberrationen, an denen das IV. Chromosom beteiligt ist, wurden mit Hilfe des Lageeffektes des Gens c.i. gefunden.

Einige Eigentümlichkeiten der Chromosomen- aberrationen

Für die Chromosomenaberrationen sind folgende zwei Eigentümlichkeiten festgestellt worden, die Bezug auf die hier in Rede stehende Frage haben.

Eine der Eigentümlichkeiten der Chromosomenaberrationen besteht im phänotypischen oder letalen Effekt, der eine bedeutende Zahl dieser Mutationen begleitet. Dieser in der Nähe der Bruchstelle entstehende Effekt weist auf eine Veränderung der Erbsubstanz im gegebenen Punkt des Chromosoms hin.

Die zweite Eigentümlichkeit des Prozesses der Chromosomenaberrationen besteht darin, daß jede Chromosomenaberration nicht weniger als zwei Brüche aufweist. Daher sehen wir, daß alle Translokationen reziprok sind, während andererseits Aberrationen mit nur einem Bruch nicht beobachtet werden.

Für Chromosomenaberrationen, die in genetisch aktivem Material stattfinden, kann dieser Satz als bewiesen betrachtet werden. Die endgültige Lösung dieser Frage war mit dem Studium der Riesenchromosomen in den Speicheldrüsen verknüpft, doch wurde sie auch schon früher diskutiert. So stellte B. McClintock im Jahre 1931 in ihren zytologischen Untersuchungen der Meiosis bei *Zea mays* fest, daß alle von ihr gefundenen Translokationen reziprok sind, und im Jahre 1932 gab dieselbe Verfasserin ein Schema der Entstehung dieser Translokationen auf Grund nichthomologer Konjugation. H. J. MULLER (1932) kam der Lösung der uns hier interessierenden Frage am nächsten; auf Grund von an *Drosophila* erhaltenen Tatsachen stellt er die Frage in ihrem ganzen Umfange, gibt ihr aber nicht eine völlige und positive Lösung, indem er darauf hinweist, daß der reziproke Charakter der Brüche nicht eine universelle Regel ist; im Jahre 1934 führt er weiter gleich BELLING Schemata einfacher (nicht reziproker) Translokationen und End-deficiency's als einige der Mutationstypen an. N. P. DUBININ, G. G. TINIAKOW und N. N. SOKOLOV (1935 und unveröffentlichte Angaben) haben aber bei der Untersuchung der Chromosomen in Speicheldrüsekernen bei F_1 -Nachkommen von röntgenisierten Männchen festgestellt, daß alle Chromosomenaberrationen (die in aktiven Regionen der Chromosomen stattgefunden haben) mit zwei oder mehr Brüchen verknüpft sind und daß Aberrationen mit nur einem Bruchpunkt nicht vorkommen.

Eine von diesen Verfassern durchgeführte eingehende Analyse mehrer Hundert einfacher und komplizierter Aberrationen zeigte, daß diese Eigentümlichkeit eine allgemeine Regel für alle Typen von

im aktiven Teil der Chromosomen stattfindenden chromosomalen Verlagerungen ist.

Beide behandelten Eigentümlichkeiten der Chromosomenabberationen haben Bezug auf die uns in dieser Arbeit interessierenden Fragen und werden unten besprochen werden.

Untersuchung der Chromosomenstruktur im Punkt der Chromosomenaberration

Wiederholt ist die Meinung ausgesprochen worden, daß die Chromosomenaberrationen von Zerstörungen und Verlusten in der Erbsubstanz begleitet werden. Im Falle künstlich ausgelöster Chromosomenaberrationen wurden diese Veränderungen einer direkten oder indirekten Wirkung der X-Strahlen zugeschrieben. In diesem Falle stellte man sich die Chromosomenaberrationen als grobe Veränderungen vor, die hauptsächlich unter Einwirkung äußerer Ursachen entstehen.

In gewissem Maße kommt diese Vorstellung auch in jener Hypothese über den Entstehungsmechanismus der Chromosomenaberrationen zum Ausdruck, die eine Zerstückelung des Chromosoms und eine darauf folgende Anheftung der freien Fragmente annimmt. In allgemeinerer Form wurde diese Hypothese von STADLER (1932) ausgesprochen. Die mit diesem Problem verknüpften Fragen sind wiederholt diskutiert worden (BRIDGES 1923, MULLER und ALTENBURG 1930, NAWASCHIN 1931, MULLER 1932, LEWITZKY und ARARATIAN 1933, DUBININ und KHVOSTOVA 1935 u.a.).

Der letale Effekt und der sichtbare phänotypische Effekt, die eine gewaltige Zahl von Chromosomenaberrationen begleiten, wiesen gleichsam auf das Vorhandensein von Zerstörungen in den Aberrationen erlittenen Chromosomen hin. Eine ganze Reihe von Autoren sprach sich für die Vorstellung aus, daß der die Chromosomenveränderungen begleitende letale Effekt die Folge solcher Zerstörungen in der Erbsubstanz ist (BRIDGES 1923, MULLER u. ALTENBURG 1930, DEMEREC 1935, MACKENSEN 1935 u.a.).

Neben solchen Vorstellungen wurde aber auch die Möglichkeit einer Erklärung der letalen Effekte als eine Erscheinung des Positionseffektes erwogen. So z.B. behandeln MULLER und ALTENBURG in ihrer Arbeit des Jahres 1930 diese Möglichkeit, lehnen sie aber ab. Weiter aber beginnt MULLER (1932) dieser Erklärung des letalen Charakters der Chromosomenaberrationen eine große Bedeutung zuzugestehen. Andere Autoren sprachen sich auch für die Möglichkeit einer Anwendung dieser Erklärung (SSACHAROW 1935 u.a.) aus.

In gegenwärtiger Zeit können wir etwas näher ans Studium der Aberrationen erlittenen Chromosomenregionen hinantreten und die Frage nach dem Vorhandensein von Zerstörungen in den Chromosomen mit genügendem Genauigkeitsgrad lösen.

Die Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen von *Drosophila* ermöglichen bei ihrer weitgehenden Differenzierung ein bei weitem eingehenderes Studium der in den Chromosomen bei den Aberrationen stattfindenden Veränderungen.

Betrachten wir die Inversion C II L, die als eine der beiden Cy-Inversionen –C II L und C II R– bekannt ist (gefunden von L. WARD, 1923). Einer der Brüche dieser Inversion hat in der Region 22 nach BRIDGES' Karte, gerade auf der Grenze der Abschnitte C und D, stattgefunden, wie dies auf Abb. 2 gezeigt ist, der andere (proximale) Bruch—auf der Grenze der Regionen 33 F und 34 A¹⁾. Abb. 2 zeigt

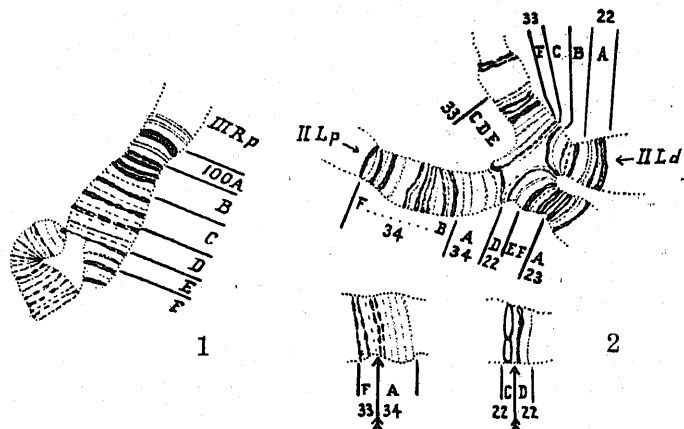


Abb. 1. Struktur des distalen Endes des rechten Armes des III. Chromosoms und die allerhäufigste Lage des Bruchs im IV. Chromosom. Fall einer heterozygoten Translokation. Konjugation des normalen III R mit dem Chromosomenkomponent IV d-III R p. Abb. 2. Strukturen der Chromosomenabschnitte in II L, die den Bruchpunkten in der Inversion C II L-Cy anliegen. Konjugation des normalen II. Chromosoms mit dem die Inversion C II L-Cy tragenden Chromosom. Es sind nur die an den Grenzen der Inversion liegenden Chromosomenabschnitte abgebildet.

die Inversion C IIL im heterozygoten Zustande. Bei der Untersuchung der entsprechenden Abschnitte im zerbrochenen Chromosom können wir hier vollständig alle Scheiben rechts und links von den Bruchstellen im normalen Chromosom beobachten. Es sei übrigens hervorgehoben, daß wir im Vergleich zu BRIDGES' Karte in der Gegend 22 C eine überschüssige (punktierte) Scheibe beobachten.

1) Die Grenzen von C II R: 42 A unmittelbar nach der doppelten „zusammengesetzten“ Scheibe und 58 auf der Grenze der Abschnitte A und B.

Auf Abb. 3 ist die reziproke Translokation No. 16 (die Nummer ist die von DUBOWSKY und KELSTEIN) abgebildet. Der Bruch hat hier im III. Chromosom in der Gegend 64 B nach BRIDGES' Karte, zwischen

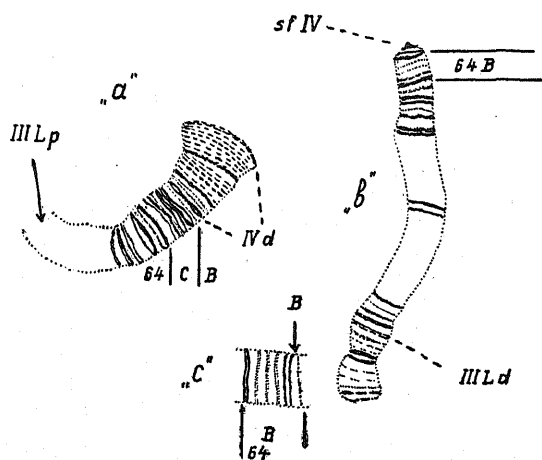


Abb. 3. Struktur der Abschnitte des III. Chromosoms in der Nähe der Bruchstelle in der Translokation No. 8 Serie 2 (III.-IV. Chromosom). „a“—Struktur des Chromosomenkomplexes IV d—III L p. „b“—der Chromosomenkomplex III L d—IV p. „c“—Lage des Bruchpunktes auf BRIDGES' Karte. „B“—der Bruchpunkt. „Sf“—Abheftungsstelle der Spindelfaser (diese wird nur bedingungsweise angegeben, ohne daß unmittelbar das Leitkörperchen gemeint wird). „p“—proximaler Teil des Chromosoms. „d“—distaler Teil des Chromosoms.

den Scheiben 12 und 13, stattgefunden; alle Einzelheiten der Chromosomenstruktur sind in den neu erhaltenen Chromosomenkomplexen III Ld—IV p und IV d—III L p zu sehen. Somit lassen sich in den Chromosomen der Speicheldrüsekernen keine sichtbaren Zerstörungen oder Verluste der feinsten Struktur feststellen.

Beide angeführten Fälle sind aber homozygot lebensfähig, d.h. werden nicht von einem letalen Effekt begleitet (im III. Chromosom ist der Lageeffekt nicht untersucht, im IV. aber

haben wir es hier mit einem solchen zu tun¹⁾). Daher könnte angenommen werden, daß die Chromosomenstruktur nur bei einer gewissen Kategorie von Chromosomenaberrationen, und zwar solcher, die nicht von einem letalen oder anderen Effekt begleitet werden, erhalten bleibt.

Doch ist dies augenscheinlich nicht der Fall. Auf Abb. 4 ist eine reziproke Translokation zwischen dem II. und III. Chromosom dargestellt, die von einem letalen Effekt begleitet wird. Wie durch Pfeile angegeben ist, hat der Bruch in II R in der Gegend 48 A und in III R in der Gegend 99 D stattgefunden. Alle Scheiben, die sich im normalen Chromosom zu beiden Seiten der Bruchpunkte befinden, können auch in den sich ergänzenden verlagerten Chromosomenabschnitten gefunden werden.

Somit ändert auch eine von einem letalen Effekt begleitete

1) Der Letalfaktor in II L ist nicht mit der Chromosomenaberration verknüpft.

Chromosomenaberration nichts in der sichtbaren Struktur der Chromosomen (außer der Verlagerung bestimmter Abschnitte).

Der Prozeß des „Bruchs“ und der „Anheftung“ findet so fein und genau statt, daß die Struktur des Chromosoms nicht verändert wird und dieselbe nach dem Aberrationsprozeß ebenso aussieht wie vor ihm.

Wir führen weiter eine ganze Reihe anderer Beispiele von reziproken Translokationen zwischen dem III. und IV. Chromosom an, an welchen man sich überzeugen kann, daß die feinste Ausgangsstruktur des III. Chromosoms nach der Chromosomenaberration wiederhergestellt werden kann, so daß neue Chromosomenzusammenhänge sich ohne irgendwelche Verluste oder Zerstörungen in der Erbsubstanz bilden.

Auf Abb. 5 ist die Aberration No. 217 dargestellt, die das IV. und III. Chromosom ergriffen hat. In diesem Falle beobachten wir gleichzeitig mit der Translokation eine kleinen Abschnitt

des Chromosoms (96 C–97 E) ergriffene Inversion in III R. Einer der Bruchpunkte der Inversion fällt mit dem Translokationspunkt zusammen. Somit haben wir es hier mit einem Fall zweier miteinander verknüpfter Aberrationen zu tun. Die Brüche in III R haben in der Gegend 97, im Abschnitte E stattgefunden, wie dies durch einen Pfeil angegeben ist. Die Struktur der Region 97 E im zerbrochenen Chromosom ist vollständig in den Figuren „a“ und „b“ zu

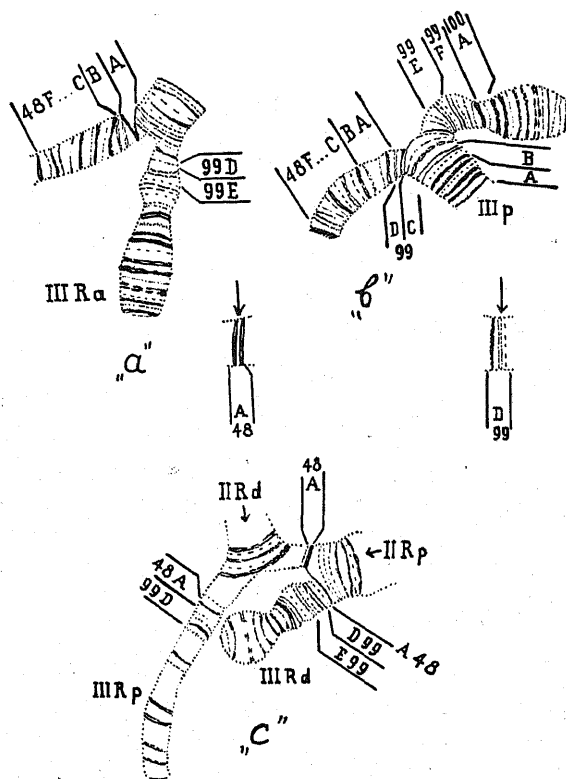


Abb. 4. Struktur der Chromosomenabschnitte, die in der Nähe der Bruchpunkte der eine reziproke Translokation erlittenen II. und III. Chromosomen liegen. „a“—Konjugation des normalen II. Chromosoms mit dem Chromosomenkomponent III R d–II R p. „b“—Konjugation des normalen III. Chromosoms mit dem Komponent II R d–III R p. „c“—fast völlige Konjugation des normalen II. Chromosoms mit den Stücken des zerbrochenen II R.

beobachten, die die neuem Chromosomenabschnitte darstellen. Die Struktur der Region 96 C D zeigt sich im Chromosomenkompond

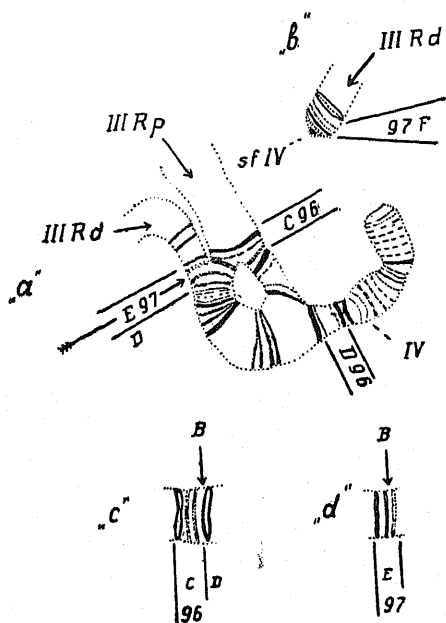


Abb. 5. Struktur der Abschnitte des III. Chromosoms, die in der Nähe des Bruchpunktes in der Chromosomenaberration No. 217 liegen. Eine reziproke Translokation zwischen III R und IV, die gleichzeitig von einer Inversion in III R begleitet wird; ein Bruch dieser Inversion fällt mit dem Translokationsbruch zusammen. „a“—Konjugation des normalen III. Chromosoms mit dem Kompond IV d—Inversion (III m)—III R p. „b“—proximaler Teil des Chromosomenkomponds III R d—IV p, im haploiden Zustande. „c“ und „d“—Lage der Bruchpunkte auf der Karte.

len Chromosom verglichen werden. Wir sehen, daß das an der Aberration nicht teilgenommene III. Chromosom in der Gegend 63 C—D dieselbe Struktur wie das die Aberration erlittene Chromosom hat.

Auf Abb. 7 ist eine reziproke Translokation zwischen dem III. und IV. Chromosom (No. 34 DUBOWSKY und KELSTEIN) abgebildet. Der Bruch hat auf der Grenze von 93 F und 94 A stattgefunden, wie durch einen Pfeil angegeben ist; man sieht, daß aus den auseinandergerissenen Abschnitten des III. Chromosoms vollständig das Bild der Struktur der Region 93 F—94 A nach BRIDGES' Karte zusammengestellt werden kann.

Wie schon erwähnt wurde, konnte nicht immer, nicht auf jedem

III—IV, der die Inversion III R trägt. Auf Abb. 6-a sehen wir eine fast vollständige Konjugation des invertierten Abschnittes mit dem normalen Homologen. Somit ist die Struktur des Chromosoms sowohl nach den bei der Inversion stattgefundenen als auch nach den mit der Translokation verknüpften Brüchen normal geblieben.

Auf Abb. 6 sind die Ergebnisse der zytologischen Analyse der Translokation No. 97 (III.—IV. Chromosom) dargestellt. Der Bruch im III. Chromosom befindet sich auf der Grenze der Abschnitte C und D in der Region 63. Die Struktur des Abschnittes 63 C läßt sich im Chromosomenkompond III L d—IV p erkennen, der auf Abb. 7-a dargestellt ist. Die Struktur des Abschnittes 63 D des zerbrochenen Chromosoms kann an Hand der Abb. 7-b mit der Struktur desselben im norma-

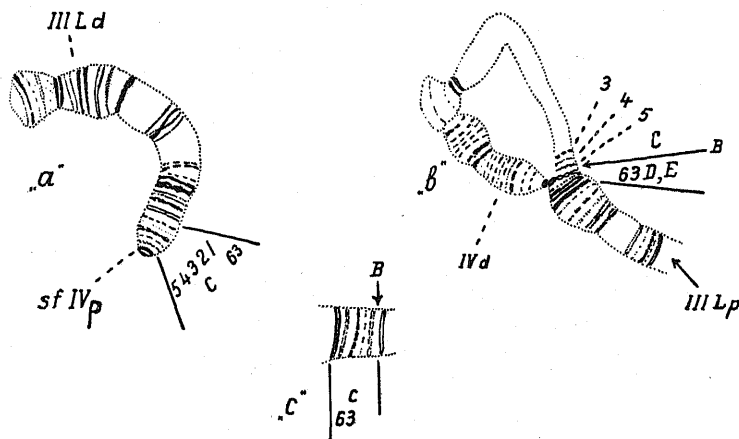


Abb. 6. Struktur der Abschnitte des III. Chromosoms, die in der Translokation No. 97 (zwischen dem III. und IV. Chromosom) dem Bruchpunkt anliegen. „a“—der Chromosomenkomponent III L d-IV p im diploiden Zustande (Hyperploid). „b“—Konjugation des normalen III. Chromosoms mit dem Komponent IV d-III Lp. „c“—Lage der Bruchstelle auf BRIDGES' Karte. Die übrigen Bezeichnungen dieselben, wie auf Abb. 3.

Präparat das vollständige Bild nach BRIDGES' Karte gefunden weredn, feine und allerfeinste Scheiben liessen sich laut der Karte zuweilen nicht erblicken, doch konnte in solchen Fällen ein Vergleich mit der Struktur des unter gleichen Bedingungen bearbeiteten normalen Homologons (in heterozygoter Aberration) angestellt werden. Hierbei konnten wir in die Aberration erlittenen Chromosom immer alle Scheiben entsprechend den Scheiben des normalen Homologons in den der Bruchstelle anliegenden Gegenden beobachten. Und wenn im aberranten Chromosom gewisse feine Scheiben nach BRIDGES'

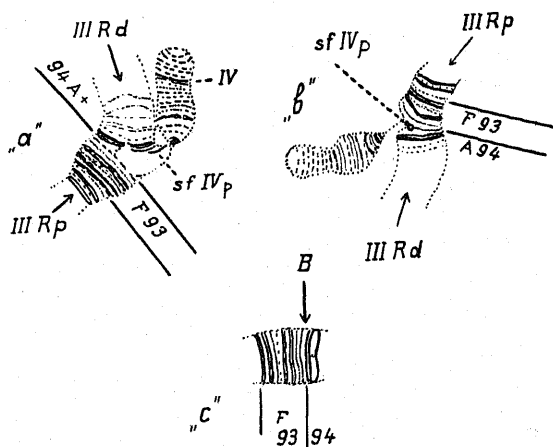


Abb. 7. Struktur der Abschnitte, die unmittelbar dem Bruchpunkt im III. Chromosom in der reziproken Translokation (zwischen dem III. und IV. Chromosom) No. 34 anliegen. „a“ und „b“—fast völlige Konjugation des normalen III. Chromosoms mit den beiden neuentstandenen Chromosomenkomponenten III R d-IV p und IV d-III R p. „c“—Lage des Bruchpunktes auf der Karte. Die übrigen Bezeichnungen dieselben, wie auf Abb. 3. Von der Region 94 A sind auf der Abbildung nur die ersten Scheiben dargestellt.

Karte nicht gefunden wurden, so liessen sie sich auch im normalen Chromosom nicht finden.

Als Beispiel hierfür kann die auf Abb. 8 dargestellte Aberration zwischen dem III. und IV. Chromosom gelten. Es handelt sich in der Aberration No. 99 (erhalten von DUBOWSKY und KELSTEIN) um eine Deletion im IV. Chromosom und eine Einfügung des deledierten Abschnittes ins III. Chromosom.

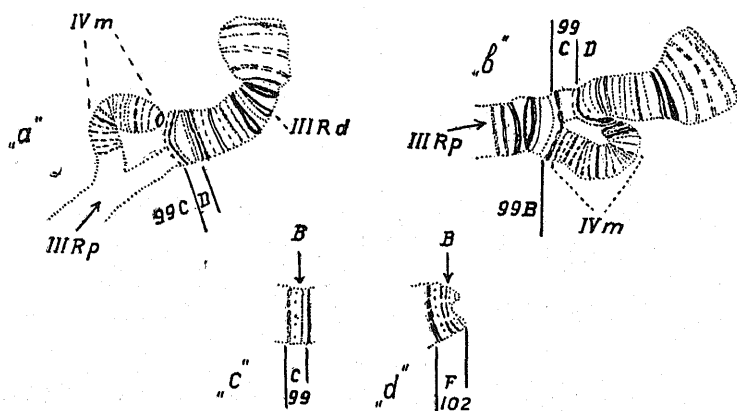


Abb. 8. Struktur der Abschnitte des III. Chromosoms, die dem Bruchpunkt in der Aberration No. 99 anliegen; diese Aberration stellt eine Einfügung aus dem IV. Chromosom ins III. Chromosom mit der Bildung eines deledierten IV. Chromosoms dar. „a“—Konjugation des normalen III. Chromosoms mit dem die Einfügung tragenden III. Chromosom; es ist die Struktur der Abschnitte rechts vom Bruch zu sehen. „b“—dasselbe, es ist die Struktur des Abschnittes des III. Chromosoms links von der Bruchstelle zu sehen. „c“—Lage der Bruchstelle des III. Chromosoms auf der Karte. „d“—Lage des distalen Bruchpunktes im IV. Chromosom auf der Karte.

Die Brüche im IV. Chromosom haben auf dem distalen Ende, wie durch einen Pfeil angegeben ist, in dem Abschnitt 102 F und auf dem proximalen Ende—auf der gewöhnlichen Stelle des bisher noch nicht genügend differenzierten Abschnittes 101 E stattgefunden, d.h. wir haben es mit einer fast vollständigen Vereinigung zweier Koppelungsgruppen zu tun. III R hat in der Gegend 99 C nach BRIDGES' Karte den Bruch erlitten, wie durch einen Pfeil gezeigt ist. Aus den Zeichnungen „a“ und „b“ ist zu ersehen, daß in dem Chromosom, in das das IV. Chromosom eingefügt ist, alle Scheiben zu finden sind, die im normalen III. Chromosom zu sehen sind, doch haben wir weder in dem noch im anderen die dritte punktierte Scheibe nach BRIDGES' Karte finden können. Weshalb sie sich auf dem gegebenen Präparat bei der gegebenen Methodik nicht hat finden lassen, läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen (augenscheinlich ist es zu einer Verschmelzung mit der dicken vorangehenden Scheibe gekom-

men), doch sind alle im normalen Chromosom beobachteten Strukturen auch in dem aberranten Chromosom vorhanden. Ein ähnliches Bild ist auch im Falle der Aberration No. XXI zu beobachten, die eine reziproke Translokation zwischen dem III. und IV. Chromosom darstellt. Die Resultate der Analyse (Abb. 9 „a“ und „b“) zeigen völlig identische Bilder in beiden homologen dritten Chromosomen im Abschnitt 91 B, obzwar die auf der Karte abgebildete 7-te dünne punktierte Scheibe nicht gefunden worden ist.

Um sich klarer den Genauigkeitsgrad der Analyse all dieser Veränderungen vorzustellen, können folgende Berechnungen durchgeführt werden.

Da in einer ganzen Reihe von Fällen eine Beständigkeit der einzelnen Scheiben festgestellt werden kann, so ist die Berechnung fürs III. Chromosom folgendermaßen durchzuführen.

Nach den letzten Angaben zählt BRIDGES (1936) in allen Chromosomen von *D. melanogaster* ca. 5000 Scheiben. Von dieser Zahl ausgehend, entfallen aufs III. Chromosom ca. 2000 Scheiben. Die Länge des III. Chromosoms beträgt nach BRIDGES 485 μ . Wenn wir annehmen, daß das Chromosom in den Speicheldrüsenzellen nicht wächst und von den metaphatischen Chromosomen sich nur durch den ausgezogenen Zustand der Spiralwindungen unterscheidet, und wenn wir die Zwischenräume zwischen den Scheiben nicht in Betracht ziehen, so läßt sich die Größe einer Scheibe mit $\frac{485}{2000} = 0,24 \mu$ bestimmen. Wenn aber unter anderen gleichen Bedingungen die Entfernung zwischen den Scheiben mit in Betracht gezogen wird —die angeführten 485 μ enthalten ja diese Entfernung—, so ist der Nenner mindestens mit 2 zu multiplizieren, und die Größe des mit

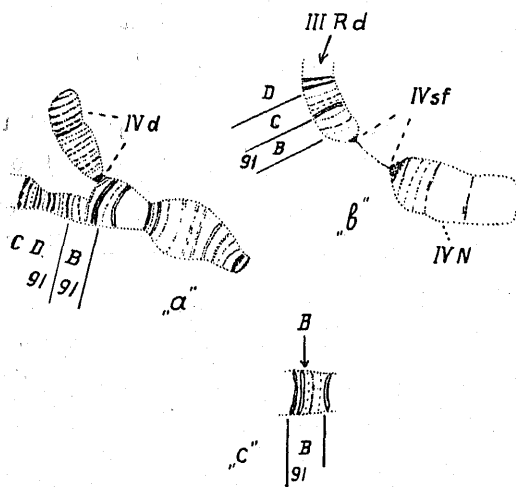


Abb. 9. Struktur der Abschnitte des III. Chromosoms, die in der Nähe des Bruchpunktes in der reziproken Translokation (zwischen dem III. und IV. Chromosom) No. XXI liegen. „a“—Konjugation des normalen III. Chromosoms mit dem Chromosomenkomponent IV d-III R p. „b“—proximaler Teil des Chromosomenkomponents III R d-IV p. „c“—Lage des Bruchpunktes auf BRIDGES' Karte. IV-N-2 freie IV. Chromosomen, die übrigen Bezeichnungen dieselben, wie auf Abb. 3.

der von uns angewandten Methode analysierbaren Abschnittes wird so bis auf $\frac{485}{4000} = 0,12 \mu$ reduziert.

Also befindet sich die Größe der von uns analysierten Chromosomenabschnitte bei recht vorsichtiger Berechnung, die nicht einmal die inerten Chromosomenabschnitte und die Möglichkeit eines Wachstums in Betracht zieht, ungefähr zwischen $0,24 \mu$ und $0,12 \mu$, wobei diese Größe eine Scheibe und die Entfernung bis zur nächsten in sich einschließt.

Der Prozeß der Chromosomenaustausche wird von uns also mit einer Genauigkeit bis zu $\frac{1}{4000}$ des Chromosoms untersucht. In diesem Prozeß der Chromosomenaberrationen werden von uns keine Störungen oder Verluste festgestellt, die derart kleine Abschnitte ($0,24-0,12 \mu$) ergreifen.

Hier sei erwähnt, daß nach MULLER's Angaben (1935) die maximale Größe eines einzelnen Gens $1/8 \mu$ ($0,12 \mu$) beträgt. Diese Berechnungen wurden auf Grund der Untersuchung einer Gruppe von Genen (y, ac, sc, 1) durchgeführt, die sich in einer der Chromomeren (Scheibengruppe) des distalen Abschnittes des X-Chromosoms befinden. Bei der zytogenetischen Analyse (MULLER und PROKOFYEWA 1934) wurde die Größe von Abschnitten festgestellt, die 2 augenscheinlich nebeneinander liegende Gene enthalten.

Die von uns untersuchten Aberrationen zeigten eine Konstanz der Struktur von Abschnitten (Scheibe + Scheizenzwischenraum), deren Größe der Grenze von $0,24-0,12 \mu$ nahekommt, d.h. von Abschnitten, die nach ihrer Größe nicht Chromosomenabschnitte übertreffen, die, wenn von MULLER's Berechnungen ausgegangen wird, 1-2 Gene enthalten.

Somit erhebt sich die zytologische Analyse der Riesenchromosomen fast aufs Niveau der genetischen Analyse der Erbsubstanz.

Wenn wir nun alles oben Gesagte in Betracht ziehen, so müssen wir den Schluß ziehen, daß es bei den Chromosomenaberrationen nur zu einer Verlagerung der Erbsubstanz innerhalb eines Chromosoms oder zwischen nichthomologen Chromosomen ohne irgendwelche Störungen oder Verluste derselben kommt. Mit anderen Worten: die Genbalance bleibt im Prozeß aller möglichen Chromosomenaberrationen primären Typs unverändert.

Der die Chromosomenaberrationen begleitende Letaleffekt als ein Fall des Lageeffektes

Bei Betrachtung der angeführten Angaben sehen wir, daß die Chromosomenaberrationen: Inversionen, Translokationen und Einfügungen so stattfinden, daß die Ausgangsstruktur des Chromosoms

keine Störungen erleidet. Dies gilt in gleicher Weise für Aberrationen, die von keinerlei Effekt begleitet werden, als auch für Aberrationen, die von einem solchen begleitet sind. Daraus folgt, daß der eine Chromosomenaberration begleitende Effekt weder mit sichtbaren Veränderungen der feinsten ($\frac{1}{4000}$ des Chromosoms!) Chromosomenstruktur noch mit irgendwelchen Verlusten der Erbsubstanz verknüpft ist, wie dies auch bei der Entstehung von Genmutationen der Fall ist.

Was den sichtbaren Positionseffekt betrifft, so ist dieser Schluß durchaus nicht unerwartet. Es ist bekannt, daß der Lageeffekt sich auf Gene erstreckt, die sich in gewisser Entfernung vom Punkt des Chromosomenbruchs befinden. Hierher gehört der Fall des Lageeffektes des Gens c.i. (DUBININ, SOKOLOW, TINIAKOW 1935), für den festgestellt wurde, daß in einer ganzen Reihe von Fällen der Bruch in gewisser Entfernung von c.i. stattfindet, so daß zwischen diesem und der Bruchstelle sich andere Gene (bent) befinden; der Fall hairy (DUBININ und SIDOROW 1935), in dem Crossing-over zwischen dem Gen mit dem Lageeffekt und der Bruchstelle erhalten wurde; der Fall Cu (PANSCHIN 1935), in dem das den Positionseffekt zeigende Gen auch durch Crossing-over von der Bruchstelle getrennt wurde. Und schließlich hat das Gen A (DUBININ, unveröffentlichte Angaben) besonders klar einen Lageeffekt bei Brüchen, die in bedeutenden Entfernungen vom Punkt der primären Aberration stattfanden, gezeigt.¹⁾

Andererseits müssen wir auf Grund der Analyse einer bedeutenden Anzahl von Chromosomenaberrationen verschiedenen Typs zum Schluß kommen, daß auch der manche Aberrationen begleitende Letaleffekt eine Kategorie der Erscheinung des sogen. Lageeffektes darstellt.

Somit findet die Meinung, daß die die Chromosomenaberrationen begleitenden Letaleffekte Fälle des Lageeffektes sind (die, wie wir sahen, als Annahme von verschiedenen Autoren—MULLER 1930, 1932; SSACHAROW 1935 u.a.—ausgesprochen wurde), in der feinen Analyse einer großen Zahl verschiedener Chromosomenveränderungen ihre Begründung.

Wir müssen den Kreis der Erscheinungen, die zum Positionseffekt gehören, jetzt recht stark erweitern. Der Lageeffekt ist nicht eine seltene Erscheinung, im Gegenteil—er ist weit verbreitet; augenscheinlich kann ihn eine große Zahl von Genen zeigen, doch kommt er in einer bedeutenden Zahl von Fällen in einem Letaleffekt zum Ausdruck. In dieser Beziehung besteht ein Parallelismus zwischen den Erscheinungen des Positionseffektes und den Genmutationen.

1) Alle hier beschriebenen Fälle beziehen sich auf *Drosophila melanogaster*.

Am allerhäufigsten sind hier wie da letale Veränderungen.

Die Entstehung eines Letaleffektes im Ergebnis kleiner deficiency's, die äußerst kleine Chromosomenabschnitte ergreifen, widerspricht nicht der dargelegten Vorstellung. Nur wird in diesem Falle eins der sich ergänzenden neuentstandenen Chromosomenelemente wegen Verlust der Anheftungsstelle der Spindelfaser aus dem Kern hinausgeworfen und dieser Letaleffekt ist eine sekundäre Erscheinung.

DEMEREĆ' Entgegnung (1935) auf die Erklärung dieser Fälle nach dem von SEREBROWSKY und DUBININ vorgeschlagenen Schema hält nicht der Kritik stand, denn in den Arbeiten einer ganzen Reihe Autoren (MACKENSEN 1935, MULLER, PROKOFYEVA und RAFFEL 1935 u.a.) ist das Vorhandensein kleiner Chromosomenverlagerungen nachgewiesen worden. Es kann auf allerwinzigste Inversionen, die nur einige Scheiben ergreifen (z.B. sc^{10}), und auch auf die Aberration *scute*¹⁹ hingewiesen werden, wo, nach DEMEREĆ' Worten, in „physikalischer Weise“ ein winziger Teil aus dem X-Chromosom herausgerissen und ins II. Chromosom eingefügt wurde. Dabei handelte es sich nur um einen gewissen Teil einer Scheibe des Chromosoms in den Speicheldrüsen. Diese Aberration lebt im homozygoten Zustande. Wäre das Stückchen des X-Chromosoms nicht ins II. Chromosom eingefügt, so hätten wir es mit einem gewöhnlichen Fall eines kleinen Faktorenausfalls zu tun. Derartige Fälle kleiner Inversionen und Einfügungen sprechen für die Möglichkeit solcher Mechanismen auch in der Entstehung kleiner deficiency's (s. MULLER 1935).

Andererseits weist dies darauf hin, daß wir es auch in solchen Fällen kleiner Ausfälle mit Aberrationen zu tun haben, die durch 2 Brüche zustande kommen. Somit dürfen kleine deficiency's nicht als Beispiel der zerstörenden Wirkung der X-Strahlen gelten, wie DEMEREĆ u.a. meinen.

Schlußbetrachtungen

Die Betrachtung des Prozesses der Chromosomenaberrationen zeigt uns, daß eine seiner Eigentümlichkeiten in der Verlagerung des Erbmaterials auf Grund von 2 Brüchen besteht. Diese Verlagerung des Chromosomenmaterials findet bei all seiner Verschiedenartigkeit immer so genau und delikat statt, daß die feinsten Chromosomenstrukturen ($\frac{1}{4000}$ des III. Chromosoms) erhalten bleiben und die Genbalance, soweit die Analyse urteilen läßt, keine Veränderungen erleidet.

Die Betrachtung der Chromosomenaberrationen von diesem Standpunkte aus führt zum Schluß, daß sie ebensowenig zur Kategorie grober Chromosomenveränderungen gezählt werden dürfen wie

auch der Prozeß des Crossing-overs. Nach ihren Resultaten sind beide Prozesse gleich, in beiden Fällen bleibt die Genbalance unverändert.

Dieser intime Prozeß, der in den Chromosomen mit der Genauigkeit des Crossing-overs stattfindet, bringt eine der Grundeigenschaften der Chromosomen zum Ausdruck—die Fähigkeit zum Austausch, der in einem Falle homolog, im anderen nicht homolog ist.

Von diesem Standpunkte wäre es wohl zweckmäßig, sich von der Bezeichnung „Chromosomenaberrationen“ loszusagen und sie durch den Terminus „Chromosomenrearrangements“ zu ersetzen.

Von den oben dargelegten Erwägungen ausgehend, können wir unter anderem die durch eine Chromosomenaberration zustandegebrachte Differenzierung des Erbmaterials (im Falle der Trennung zweier Mutationen, die unter gewöhnlichen Bedingungen gekoppelt vererbt werden) als der durch Crossing-over zustandegebrachten Differenzierung äquivalent betrachten. Mit anderen Worten: dort, wo ein nichthomologer Austausch stattgefunden hat, kann auch Crossing-over stattfinden. So ist zwischen zwei Genen, die unter gewöhnlichen Bedingungen zusammen vererbt werden, nachdem sie sich durch eine Chromosomenaberration hätten trennen lassen, auch Crossing-over zu erwarten, falls sich die Verhältnisse in Richtung einer Erleichterung dieses Prozesses verändern. Als ein Fall dieser Art kann die Trennung der Gene *achaete* und *scute* in der Inversion *scute*⁸ (PATTERSON's und STONE's Angaben—1935) betrachtet werden. Hier haben DUBININ, SOKOLOW und TINIAKOW (unveröffentlichte Angaben) andererseits Crossing-over zwischen beiden genannten Genen festgestellt.

Das Vorhandensein einer Korrelation zwischen den Chromosomenrearrangements und dem Auftreten eines letalen oder phänotypischen Effektes ist nicht durch eine Zerstörung des Chromosomenmaterials auf der Bruchstelle zu erklären, sondern ist mit der Erscheinung des Positionseffektes verknüpft. Diese eigenartige Reaktion der in den dem Aberrationspunkt anliegenden Gegenden näher oder weiter lokalisierten Gene ist weit verbreitet und kommt in bedeutender Anzahl der Fälle in einem Letaleffekt zum Ausdruck, wie dies auch bei den meisten Genmutationen beobachtet wird.

Der Lageeffekt, der entweder im Letaleffekt oder in einer sichtbaren Veränderung der Merkmale zum Ausdruck kommt, weist nur auf feinere Zusammenhänge in der Erbsubstanz hin, die uns von rein morphologischen Fragen zur Genstruktur derselben oder ins Gebiet der Wechselwirkung der Gene hinüberführen. Diese Seite der Frage muß ihre Klärung bei der Lösung des Problems des Lageeffektes als solchen erhalten.

Die von kleinen Faktorenausfällen bewirkte letale Wirkung ist eine Erscheinung sekundärer Art, die nach dem Akt der Chromosomenaberration dadurch zustande kommt, daß der deletierte Chromosomenabschnitt die Fähigkeit zur Beteiligung an der Mitose verliert, denn er besitzt ja keine Anheftungsstelle der Spindelfaser. Dabei geschieht auch der Ausfall kleinster Chromosomenabschnitte auf dem Wege zweier Brüche.

Von den dargelegten Angaben und Erwägungen ausgehend, scheint es am allerwahrscheinlichsten, daß bei der Auslösung von Chromosomenaberrationen durch Röntgenisierung die Wirkung der X-Strahlen nicht direkt ist. Eher bewirken diese eine Veränderung der Verhältnisse, die zu einer Manifestierung der Grundeigenschaft der Chromosomen, einen Austausch durchzumachen, führt. Die Angaben von M. S. NAWASCHIN (1933 usw.) über den spontanen Prozeß chromosomaler Mutationen in alternden Pflanzensamen weisen auch darauf hin, daß die biologische Grundeigenschaft der Chromosomen, einen nichthomologen Austausch durchzumachen, im Vergleich zur Norm recht stark durch eine ganze Reihe von im Organismus selbst stattfindenden physiologischen Veränderungen gesteigert werden kann.

Es ist besonders hervorzuheben, daß die Speicheldrüsemethode zu einer äußerst genauen Analyse der Chromosomen führt, die 1–2 Gene enthaltende Chromosomenabschnitte erkennen läßt. Vielleicht ist die Zeit nicht weit, wo wir in weitem Maßstab diese Methode gleich der genetischen anwenden werden, d.h. mit ihr Abschnitte unterscheiden werden, die bestimmt nur ein Gen enthalten. In dieser Beziehung ist BRIDGES' Arbeit, die eine eingehende Analyse der Struktur der Riesenchromosomen gibt, von großer Bedeutung. Schon jetzt ist es klar, daß die Resultate dieser Arbeit sich nicht auf die Zusammenstellung der Karte beschränken.

Unser Versuch der Anwendung dieser Karte zeugt von einem hohen Identitätsgrad derselben mit der realen Struktur der Chromosomen. Die weiteren Veränderungen der Karte werden hauptsächlich die Zergliederung dicker Scheiben betreffen.

Andererseits müssen wir darauf hinweisen, daß unsere Angaben über die Beständigkeit der diskoiden Struktur der Chromosomen davon zeugen, daß die Brüche zwischen den Scheiben stattfinden. Dieser Umstand unterstreicht noch einmal die besondere Bedeutung der Differenzierung des genetisch-aktiven Teils der Speicheldrüsenchromosomen. Doch sind wir der Meinung, daß zur Verknüpfung dieser Differenzierung der Chromosomen mit ihrer genetischen Gliederung, im einzelnen zur Identifizierung der Genloci mit den Scheiben, direkte zytogenetische Beweise angeführt werden müssen, die uns heute noch fehlen.

Literatur

1. Bridges, C. B. 1923. The translocation of a section of chromosome II upon chromosome III in *Drosophila*, Anat. Record, V. 24: 426.
2. — 1935. Salivary chromosome maps, J. of Heredity, V. 26: 60-64.
3. Demerec, M. 1935. Rôle of genes in evolution, Amer. Nat., V. 69: 139.
4. Dubinin, N. P., N. N. Sokolow und G. G. Tiniakow, 1935. Zytologische Analyse des Positionseffektes, Biol. Shurn., Bd. 4, No. 4 (russisch).
5. — und B. N. Sidorow. 1935. Der Positionseffekt des Gens „hairy“, Biol. Shurn., Bd. 4 No. 4 (russisch).
6. — und W. W. Khvostova. 1935. Der Bildungsmechanismus komplizierter Chromosomenreorganisation, Biol. Shurn., Bd. 4., No. 6 (russisch).
7. Lewitzky, G. A. und A. G. Araratian, 1933. Umbildung der Chromosomen unter Einwirkung der X-Strahlen, Verhandl. über angewandte Botanik, Genetik und Selektion, Bd. 27, H. 3 (russisch).
8. Mackensen, O. 1935. Locating genes on salivary chromosome, J. of Heredity, V. 26: 163-174.
9. McClintock, B. 1931. Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and inversion in *Zea mays*, University of Missouri Research Bulletin, 163.
10. — 1932. The association of nonhomologous parts of chromosomes in the mid prophase of meiosis in *Zea mays*, Z. f. Zellforsch. u. mikr. Anat., Bd. 19, H. 2.
11. Morgan, Th. H., C. B. Bridges and J. Schultz. 1935. Report of investigations on the constitution of the germinal material in relation to heredity, Carn. Inst. of Wash. Year-Book, No. 34, 1934-35.
12. Muller, H. J. 1932. Further studies on the nature and cause of gene mutations, Proc. of Sixth Intern. Congr., V. 1: 213-255.
13. — 1934. The effects of Röntgen Rays upon the hereditary material, Sc. of Radiology.
14. — 1935. On the dimensions of chromosomes and genes in dipteran salivary gland, Amer. Nat., V. 69, 405.
15. — 1935. The origination of chromatin deficiencies as minute deletions subject to insertion elsewhere, Genetica, V. 17: 237-252.
16. — and Altenburg. 1930. The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila*, Genetics, V. 16, No. 4.
17. — and A. A. Prokofyeva. 1934. Continuity and discontinuity of the hereditary material. C. R. d. Acad. Sc. d. USSR, 4: 74-83.
18. —, A. A. Prokofyeva and D. Raffel. 1934. Minute intergenic rearrangements and a cause of apparent gene mutation, Nature...
19. Nawashin, M. S. 1931. A preliminary report on some chromosome alterations by X-rays in *Crepis*, Amer. Nat., 65.
20. — 1931. Spontaneous chromosome alterations in *Crepis*, Univ. California, Publ. in Agric. Sc., V. 6.
21. — 1933. Altern der Samen als Ursache der Chromosomenmutationen, Planta, Arch. f. wiss. Botanik, Bd. 20, No. 1-11 (und andere).
22. Painter, Th. S. and W. Stone. 1935. Chromosome fusion and speciation in *Drosophila*, Genetics, 20: 327-341.
23. Panschin, J. B. 1935. Neue Beweise der Richtigkeit der Hypothese des Positionseffektes, C. R. d. Acad. d. Sc. d. USSR, V. 4, No. 1-2 (russisch).
24. Patterson, J. T. and W. S. Stone. 1935. Some observations on the structure of the Scute-8 chromosome of *Drosophila melanogaster*, Genetics, V. 20: 172-178.
25. Ssacharow, W. W. 1935. Zytologische Untersuchung der Letalfaktoren des Geschlechtschromosoms bei *D. melanogaster*, C. R. d. Acad. Sc. d. USSR, V. 4, No. 1-2 (russisch).
26. Stadler, L. S. 1932. On the genetic nature of induced mutations in plants, Proc. of the Sixth Intern. Congr. of Genet., V. 1.
27. Ward, L. 1923. The genetics of curly wing in *Drosophila*, another case of balanced lethal factors, Genetics, V. 8: 276.

A Morphological and Taxonomical Study on Japanese *Microlepia*

By

Takenoshin Nakai and Siduo Momose

I. Four different types of *Microlepia*

Having had *Scypholepia* and *Leptolepia* eliminated from the genus *Microlepia*, the remaining species form a natural group in the tribe *Dennstædtieæ* of polypods family. *Scypholepia*¹⁾ provided with articulated undivided pinnæ is easy to distinguish from *Microlepia*. *Leptolepia*²⁾ has finely dissected leaves as *Davallia*. Its indusium adheres to the segments of leaves by its truncate or subcordate base, differing widely from the indusium of *Microlepia* which adheres by rounded or triangular basal margins. It should be regarded also as a distinct genus. Two sections were proposed for the species of *Microlepia*, i.e. *Wilfordia*³⁾ and *Davallodes*.⁴⁾ The former is represented by a single species *Microlepia Wilfordii* with entirely glabrous fronds and marginal sori. BAKER⁵⁾ and CHRIST made a mistake in reducing it to the genus *Davallia*. It has, however, fronds inarticulated with the rhizome, hairs on the rhizome instead of scales, and gradatæ-sori⁶⁾ (Fig. 1). *Davallia* has, as a rule, fronds articulated with rhizome, scales on the rhizome, mixtæ-sori,⁷⁾ and bilateral periumless spores. KOIDZUMI⁸⁾ is more reasonable in putting it under *Dennstædtia*, and CHRISTENSEN⁹⁾ has similar opinion. However, it is still separable from *Dennstædtia* by having wholly glabrous (not hirsute or papillose) fronds, and not reflexed sori when ripen. *Davallodes*¹⁰⁾ was raised to the generic rank later by COPELAND. As his first diagnoses were not adequate, he altered the generic sense.¹¹⁾ Its principal difference from *Microlepia* is the form of its indumentum on rhizome. The indumentum is not constituted by true hairs, but

1) *Scypholepia* J. Smith, Hist. Filic. 261 (1875).

2) *Leptolepia* METTENIUS in KUHN, Chætopteroides 348 (1882).

3) *Davallia* sect. *Wilfordia* CHRIST, Farnkr. 305 (1897).

4) *Microlepia* sect. *Davallodes* COPELAND, Polyp. Philippin Isl. 55 (1906).

5) *Davallia Wilfordii* BAKER in HOOKER et BAKER, Syn. Filic. ed. 1, 98 (1867).

6-7) For the terms of gradatæ and mixtæ see BOWER's Studies in the Morphology of Spore-producing Members IV, in Phil. Trans. CXCI, B. (1899).

8) *Dennstædtia Wilfordii* KOIDZUMI in MAYEBARA, Fl. Austro-Higoensis 2 (1931).

9) *Davallia Wilfordii* MOORE—An potius *Dennstædtia*? CHRISTENSEN, Ind. Filic. Suppl. III, 128 (1934).

10) *Davallodes* COPELAND in Philippin Journ. Sci. III, 33 (1908).

11) *Davallodes* COPELAND in Philippin Journ. Sci. XXXIV, 242 (1927).

of peltate scales ended by hair. The sori are intramarginal like *Microlepia*, but the indusium is thinner. The type of *Davallodes* is *Microlepia hirsuta* or *Davallia ciliata* HOOKER. J. SMITH had once put it under the genus *Leucostegia*,¹⁾ but *Leucostegia* has articulated herbaceous fronds, orbicular or depressed, coriaceous indusium, broad scales on rhizome.

In fact, *Davallodes* is most closely allied to *Microlepia*. Except the peltate scaly base of the indusium, the other distinctive characteristics are too weak in proving its generic value.

Farther investigation is necessitated before *Davallodes*

is fully recognised as a genus. *Microlepia pilosella* is allied to *Davallodes*. It has, however, true hairs on rhizome, and real marginal sori as *Wilfordia*, but its fronds and indusia are pilose. It is a type which does not concord with any of described groups. So, I shall call it as *Pilosella*-type for the time being. To Japan, the following nine species are indigenous.

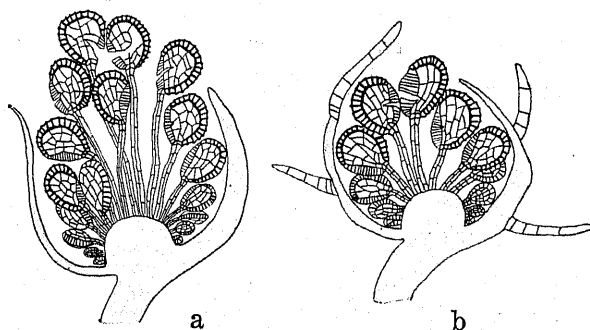


Fig. 1. Longitudinal section of gradatae sori of a. *Microlepia Wilfordii*, b. *Microlepia pilosella*, (Magnified 20 times).

1. *Microlepia hirsuta* (J. SMITH) PRESL (*M. trichocarpa* HAYATA syn. nov.)
2. *M. majuscula* (LOWE) MOORE (*M. obtusiloba* HAYATA, syn. nov.)
3. *M. marginata* (HOULTUYN) CHRISTENSEN
4. *M. pilosella* MOORE
5. *M. platyphylla* (DON) J. SMITH (*M. grandissima* HAYATA, syn. nov.)
6. *M. Speluncæ* (LINNÆUS) MOORE
7. *M. strigosa* (THUNBERG) PRESL
8. *M. subtripinnata* HAYATA
9. *M. Wilfordii* MOORE

The subsection of these nine species are as follows:

- I. *Microlepia* Sect. *Eumicrolepia* CHRIST²⁾
M. majuscula, *M. marginata*, *M. platyphylla*, *M. Speluncæ*,
M. strigosa, *M. subtripinnata*.

1) *Leucostegia hirsuta* J. SMITH, Hist. Filic. 84 (1875).

2) *Microlepia* sect. *Eumicrolepia* CHRIST, Farnkr. 307 (1897).

- II. *Microlepidia* Sect. *Davallodes* COPELAND
M. hirsuta.
 III. *Pilosella*-type
M. pilosella.
 IV. *Microlepidia* Sect. *Wilfordia* (CHRIST) nob.
M. Wilfordii.

So far as the spores are concerned, both *Microlepidia* and *Davallodes* are the same category as all of them have smooth perinium, not agreeing with the spores of *Microlepidia Wilfordii* and *M. pilosella*.

The spore of *M. pilosella* has thick corky, slightly verrucose perinium while that of *M. Wilfordii* has granulose perinium (Fig. 2). The morphological difference of four different types of sporophytes in *Microlepidia* are briefly sketched below.

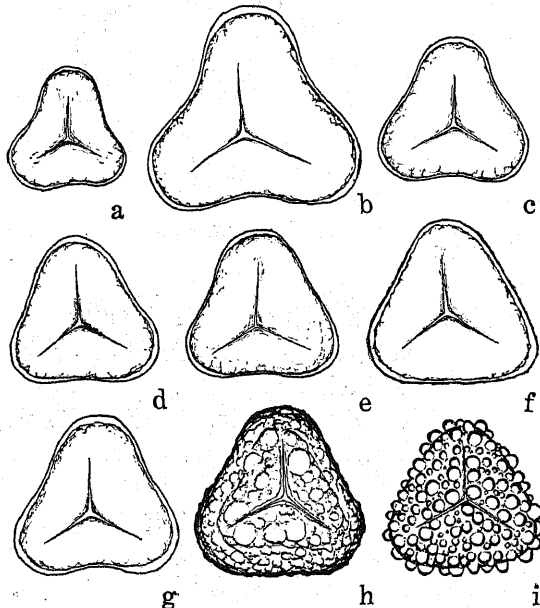


Fig. 2. Spores of *Microlepidia* and its allies. (300 times magnified). a-f. *Eumicrolepidia*. g. *Davallodes*. h. *Fuziifilix*. i. *Coptidipteris*. a. *Microlepidia majuscula*, b. *M. marginata*, c. *M. platyphylla*, d. *M. Speluncae*, e. *M. strigosa*, f. *M. subtripinnata*, g. *M. hirsuta* vel *Davallodes*, h. *M. pilosella* vel *Fuziifilix*, i. *M. Wilfordii* vel *Coptidipteris*.

I. *Eumicrolepidia*-type.

Rhizomata pilis simplicibus tomentosa. Frondes hispiduli vel ciliati. Sori intramarginales. Indusium pilosum vel hirsutum. Sporae cum perinio laeve.

II. *Davallodes*-type.

Rhizomata squamis basi peltatis apice capillaribus tomentosa.

Frondes hispidi. Sori intramarginales. Indusium pilosum. Sporae cum perinio laeve.

III. *Pilosella*-type.

Rhizomata pilis simplicibus tomentosa. Frondes hispiduli. Sori marginales. Indusium hispidum. Sporae cum perinio verruculoso.

IV. *Wilfordia*-type.

Rhizomata pilis simplicibus tomentosa. Frondes ab initio

glaberrimi. Sori marginales. Indusium glaberrimum. Sporæ cum perinio distincte granuloso.

II. Three different types of gametophytes in *Microlepia*

MOMOSE, the junior author, has chosen three species, or *M. strigosa*, *M. pilosella*, and *M. Wilfordii*, out of above nine species and made the morphological observations on their gametophytes. He could not get matured spores of *M. hirsuta* or *Davallodes hirsuta* for his experiment, as the species is restricted and rarely found in Formosa within the Japanese area. The spores were sown early in July. After three months, all developed to the adults, and prothallia of those three species manifested three notable types.

I. *Eu-Microlepia*-type by *M. strigosa*.

Midrib or cushion broaden gradually toward the growing point. Antheridial group is near the basal portion of cushion and apart from the archegonial group (Fig. 3 a). The marginal cells of prothallium have crenated edge (Fig. 4 a), but epidermal cells have obtuse rounded wall.

II. *Pilosella*-type by *M. pilosella*.

Midrib homogenous. Antheridia prevail all over the midrib and also scatter on the one layered wings around the midrib (Fig. 3 b). Marginal cells of prothallia have crenated edge. (Fig. 4 b), but epidermal cells obtuse rounded wall.

III. *Wilfordia*-type by *M. Wilfordii*.

Midrib homogenous. Antheridial group is near the basal

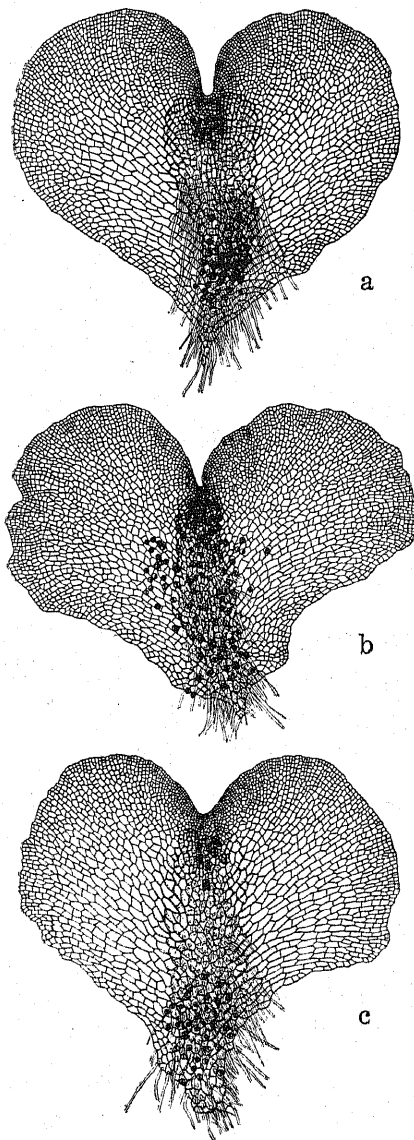


Fig. 3. a. *Microlepia strigosa*, b. *M. pilosella*, c. *M. Wilfordii*. ($\times 12.5$).

portion of midrib and apart from the archegonial group (Fig. 2 c). Both marginal and epidermal cells of prothallia have obtuse rounded wall (Fig. 3 c, d).

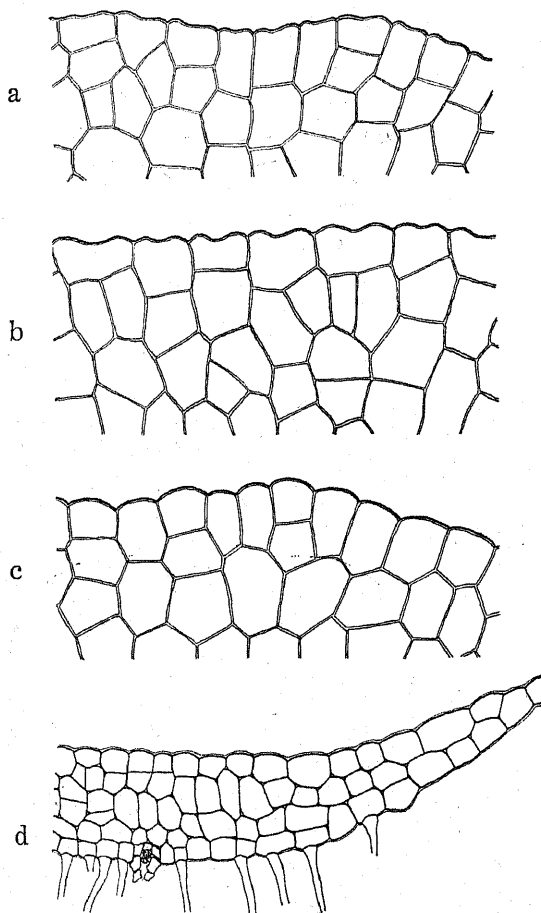


Fig. 4. a-c. Margine of prothallium; a. *Microlepidia strigosa*. b. *M. pilosella*, c. *M. Wilfordii*. d. Cross-section of protallium of *M. Wilfordii* at the archegonial part. a-c. ($\times 100$), d. ($\times 25$).

The number of spermatozoids in each antheridium varies exceedingly in the same individual, being the minimum 8 and the maximum 32. The antheridia with numerous sperms are larger, as a rule, than those with less sperms.

III. Two new genera proposed for *Microlepidia Wilfordii* and *M. pilosella*

Adding the morphological characteristics of gametophytes to those of sporophytes, both *Pilosella*-type and *Wilfordia*-type have

In the flourishing stage of prothallia, the number of initial lateral cells which developed directly from the apical cell, in *Microlepidia strigosa* and *M. pilosella* are few or 1-3 (occasionally 4) on both sides, but in *M. Wilfordii* they are always more numerous and oscillate between 4 and 7.

The antheridia of them are all alike, or the typical form of *Polypodiaceæ*. The diameter of antheridia differs somewhat in three species; in *M. strigosa* measures 70-80 μ , in *M. pilosella* 62-77 μ , and in *M. Wilfordii* 62-70 μ .

The archegonia are the typical *Polypods*-types. The neck arches back with 3 cells in the posterior side and 4-5 cells in the anterior side.

sufficient factors which dispose us to view them as two distinct genera. We shall denominate *Fuziifilix*¹⁾ for the *Pilosella*-type, congratulating the festival of seventy years anniversary of Professor FUJII, and *Coptidipteris* for *Wilfordia*-type not to make an odious name *Wilfordia Wilfordii*. *Coptidipteris* is derived from the Japanese name *Wôren-sida* which means 'Coptis-like fern'. Their generic diagnoses are the followings.

***Fuziifilix* NAKAI et MOMOSE, gn. nov.**

Rhizoma repens pilis fuscis tomentosum. Frondes annui 2-3 pinnati, lacinis angustis, toto pilosi. Sori in apice venularum terminales vulgo lobulato-producti. Indusium rotundatum vel subreniforme membranaceum hispidulum. Sporangia gradata, vel ab apice gradatim maturantia. Sporæ tetrahedrales cum perinio verruculoso. Costa prothallii longitudine æquilata. Antheridia in totam longitudinem costæ dispersa. Cellulæ marginales prothallii crenulatæ.

Genus monotypicum: *Fuziifilix pilosella* nob. (*Microlepia pilosella* MOORE) in Japonia, Korea, et Manshuria indigena.

***Coptidipteris* NAKAI et MOMOSE, gn. nov.**

Syn. *Davallia* sect. *Wilfordia* CHRIST, Farnkr. 305 (1897)

Rhizoma repens dichotome ramosum, pilis fuscis tomentosum. Frondes subdimorphi ab initio toto glaberrimi, stipitibus lucidis vulgo ebenosis; laminis tri-quadripinnatis, partibus fertilibus quam steriles distincte angustius laciniatis. Sori in apice venularum terminales marginali-producti. Indusium membranaceum rotundatum, vel cordatum, vel subreniforme, ab initio glabrum. Sporangia gradata, vel ab apice gradatim maturantia. Sporæ tetrahedrales facie distincte granulosa. Costa prothallii longitudine æquilata. Antheridia in parte basale costæ et archegonia in apice aggregata. Cellulæ marginales prothallii obtusæ nunquam crenatæ.

Genus monotypicum: *Coptidipteris Wilfordii* nob. (*Microlepia Wilfordii* MOORE) in Japonia, Korea, Manshuria, Formosa, et China indigena.

1) The spelling was purposely changed to FUZII from FUJII to be pronounced more correctly in Latin.

Secondary Pairing in *Brassica oleracea*

By

D. G. Catcheside D. Sc.

Dept. of Botany, University of London, King's College

Previous studies (Catcheside, 1934; Alam, 1935) have suggested that *Brassica* species are secondary polyploids derived from ancestors with a haploid chromosome number of six. *B. oleracea* ($n=9$) has been examined to find out in how far expectation was fulfilled in this species. The material has proved suitable for the investigation of several problems relative to secondary pairing, viz. (1) its origin, persistence and disappearance; (2) its variation in different pollen mother-cells; (3) the relation between degrees of secondary pairing at metaphase I and metaphase II; and (4) the relation between the degree of secondary pairing in the two plates at metaphase II. Data upon all these problems would yield information about the mechanics of secondary pairing and the movements of the chromosomes relative to one another during meiosis.

I am very greatly indebted to Dr. K. Mather, of the Galton Laboratory, University College, London, for making the calculations and also for valuable advice concerning the statistical treatment.

Material and Methods

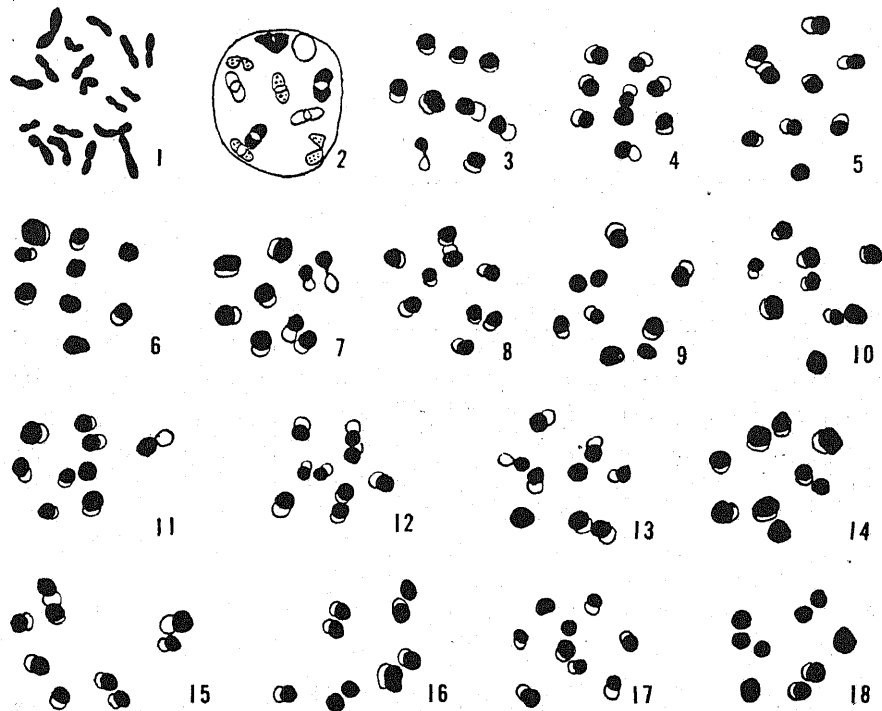
The material consists of several wild strains of *B. oleracea*, raised from seed collected at Kingsdown, Kent and Babbacombe, Devon, together with plants of Sutton's Drumhead Borecole. Root-tips were fixed in the modified Flemming previously used on similar material (Catcheside, 1934). Smears of pollen-mother-cells were also fixed in this modified Flemming and also in medium Flemming to which about 0.2% of maltose had been added. Root-tips were sectioned at about 16μ . All material was stained by the Newton iodine-gentian violet technique. All figures, except that of the somatic chromosomes (fig. 1), were drawn from smears of the Borecole, and are $\times 3,600$. No difference between the wild and the cultivated strains were noted; the numerical data were taken from three slides of Borecole.

Description

All the strains of *Brassica oleracea* examined have eighteen chromosomes in their somatic complements (fig. 1). At meiosis,

nine bivalents were regularly observed in all cells; no cases of multivalents or of univalents were seen.

At diakinesis, the nine bivalents are situated at the periphery of the nucleus such that the distances between neighbouring bivalents are approximately equal (fig. 2). The arrangement is such that



Figs. 1-18 *Brassica oleracea*. Fig. 1 Somatic metaphase plate. Fig. 2 Pollen mother-cell at diakinesis. Figs. 3-18 Pollen mother-cells at metaphase I, in polar view, showing types of secondary pairing. Fig. 3 No secondary pairing; figs. 4-6 one group of two bivalents; figs. 7-11 two groups of two bivalents each; figs. 12-15 three groups of two bivalents each; fig. 16 four groups of two bivalents each; fig. 17 one group of three bivalents; fig. 18 one group of three, and two groups of two, bivalents.

each bivalent has a number of neighbours and a complementary number of non-neighbours. The mean number of neighbours is about five. The nucleolus is also peripheral. The equidistant peripheral arrangement of the bivalents indicates that there is an approximately equal force of repulsion between all the bivalents. At late diakinesis, the repulsion appears to weaken. At any rate the distances between some bivalents diminishes and this continues during prometaphase until finally there are often one or more groups of secondarily paired bivalents. The general behaviour is consistent with the supposition that bivalents which are paired secondarily at the end of prometaphase have occupied neighbouring positions

at diakinesis. There does not seem to be any change in the relative spatial dispositions of the bivalents between diakinesis and prometaphase apart from the closer approximation, especially of some of them. It will be seen that this is borne out by the statistical data.

With the onset of full metaphase, the inter-bivalent repulsions increase so that the clustered group seen at prometaphase gradually gives place to a level plate in which bivalents, or groups of secondarily paired bivalents, are more spread out. A summary of the observed kinds of secondary pairing, recorded from three slides, is given in Table 1; drawings of the different kinds are given in

Table 1. Frequencies of secondary pairing types at metaphase in pollen mother-cells of *Brassica oleracea*

Type of metaphase plate	Numbers observed							
	Metaphase I				Metaphase II			
	Slide 1	Slide 2	Slide 3	Totals	Slide 1	Slide 2	Slide 3	Totals
9(1)	14	7	11	32	0	3	8	11
1(2)+7(1)	32	36	35	103	2	20	26	48
2(2)+5(1)	51	39	32	122	5	46	27	78
3(2)+3(1)	41	23	16	80	4	24	14	42
4(2)+1(1)	3	0	1	4	0	1	1	2
1(3)+6(1)	2	1	6	9	0	2	2	4
1(3)+1(2)+4(1)	6	7	6	19	1	11	3	15
1(3)+2(2)+2(1)	3	4	3	10	1	9	1	11
1(4)+5(1)	3	2	0	5	0	1	0	1
2(3)+3(1)	0	0	1	1	0	2	0	2
2(3)+1(2)+1(1)	0	0	0	0	0	1	0	1
Grand Totals				385				215

figs. 3–18. The observed kinds of secondary pairing at metaphase I fall into ten classes and at metaphase II into eleven classes. An inspection of the frequencies of the various classes suggests that the first four are normal and characteristic, and the remainder aberrant. The data agree well with the hypothesis (Catcheside, 1934) that the basic chromosome number in *Brassica* is six. The characteristic maximum shows three groups each of two bivalents, and three ungrouped bivalents. The characteristic classes of secondary pairing, those with none, one, two or three groups of two secondarily paired bivalents, show a unimodal variation, indicating that there is a definite law of chance governing the occurrence of secondary pairing. The aberrant classes (figs. 16–18) may be due to at least three causes: (1) inferior fixation leading to clumping and false secondary association; (2) mistaken observation; and (3) real structural complexity, especially reduplication, within the complement, in addition to the secondary polyploidy. As will be seen later, the homogeneity of the data shows that the first two causes cannot

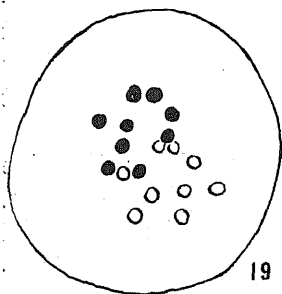
play an important part. In conformity with this view, also, is the observation that occasionally bivalents of unlike size are secondarily paired (note figs. 4, 6, 10 and 17). This is confirmed by observations of similar cases in side view, when it is possible to see that there is no difference between the two bivalents, in regard to numbers of chiasmata or configuration, such as would lead to an apparent size difference when in polar view.

At metaphase I, in the absence of secondary pairing, the nine bivalents are usually grouped two central and seven peripheral (fig. 3). Less commonly, there are one central and eight peripheral bivalents. With a single secondary pair and therefore eight independent groups, two central bivalents are still the commonest arrangement. The two bivalents of the secondary pair may be central (fig. 4) or peripheral and in the latter case either radial (fig. 5) or tangential (fig. 6) with respect to the plate. With fewer independent groups than eight, and therefore more secondary pairs, there is more frequently a single group in the centre of the plate. This group is usually a single bivalent but may be a group of two, or of three, bivalents. The different groups in the metaphase plates when two or more secondarily paired groups are present, are arranged with respect to one another in all conceivable ways, presumably at random though this is hard to test in practice. More than sixty metaphase patterns, differing in numbers and relative arrangements of secondarily paired groups, have been observed in the present material. The observations, however, cannot be conveniently summarised, the grouping of many of them is highly subjective and no valuable analysis of the data as a whole presents itself. The classification has therefore been omitted.

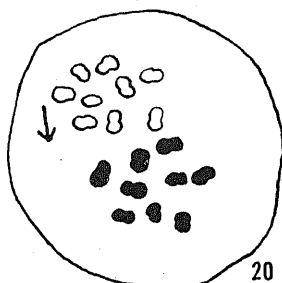
No cases of multivalent primary association have been seen. This indicates that homology of the dissimilar, secondarily pairing, chromosomes must be intermittent and only over short distances at a time.

Primary association is usually by terminal, rarely by interstitial chiasmata. The chromosomes therefore disjoin synchronously at anaphase I and move to the poles in almost flat plates. With the commencement of anaphase I, repulsion between the secondarily paired bivalents sets in intensely so that by mid-anaphase I nearly all secondary pairing has disappeared. It is completely gone by telophase I. Polar views of anaphase I plates have about the same area as metaphase I plates (cf. figs. 19 and 29 with earlier figs.). The two anaphase I plates in a pollen mother-cell correspond in the arrangement of their chromosomes. There is no movement of the chromosomes relative to one another at anaphase

except for that producing uniform spacing. Chromosomes that were secondarily paired at metaphase retain adjacent positions during anaphase and pass into the telophase nucleus as neighbours.



19

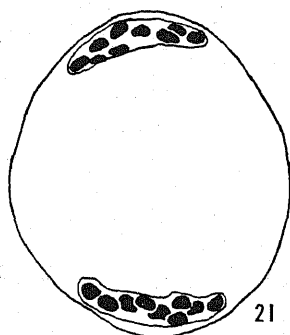


20

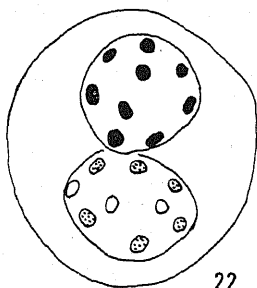
Figs. 19-20 *Brassica oleracea* pollen mother-cells at anaphase I, in polar view, showing the loss of secondary pairing.

The telophase I nucleus is constructed from the flat anaphase plate and therefore it is at first nearly flat or, strictly, concavoconvex, the concavities of the two

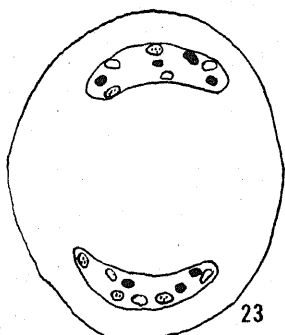
telophase nuclei of one pollen mother-cell being apposed (fig. 21). The chromosomes are equidistant in one plane; as seen in polar view



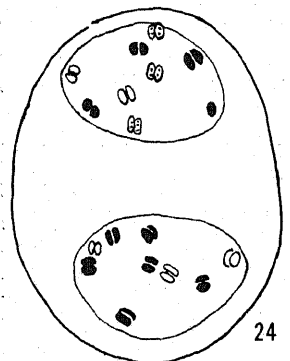
21



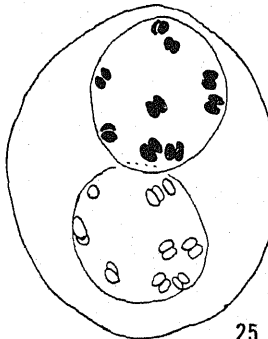
22



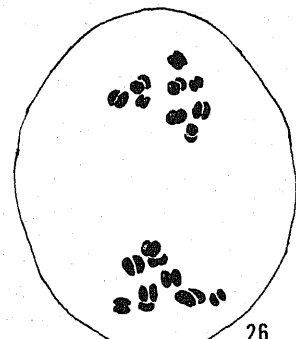
23



24



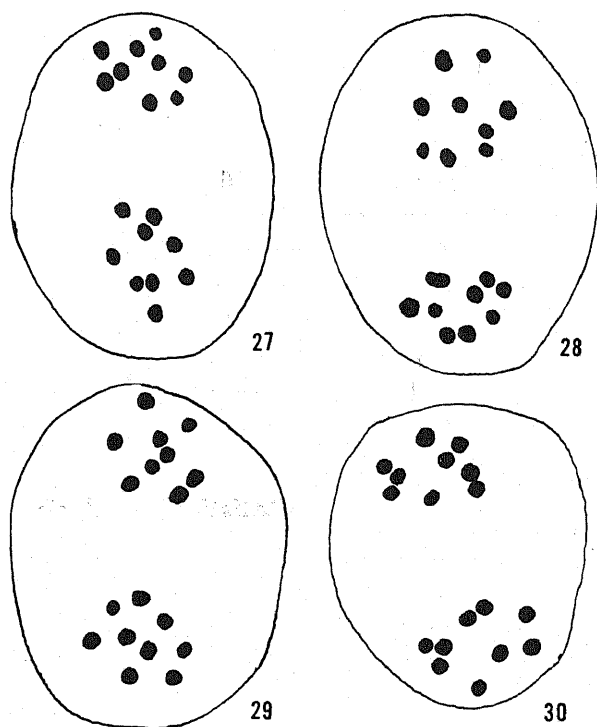
25



26

Figs. 21-26 *Brassica oleracea* pollen mother-cells at interphase stages. Figs. 21 and 22 are early telophase I in side and polar views respectively showing the flat nucleus and uniform distribution of chromosomes. Figs. 23-25 are interphase nuclei changing to a spherical shape. Fig. 26 shows prometaphase II with some cases of secondary pairing.

(fig. 22), their arrangement is like that of a metaphase I plate that lacks secondary pairing. During interphase the nucleus expands axially, remaining the same width transversely. At the same time, the chromosomes spread around the periphery (figs. 23 and 24) to give a diakinesis-like arrangement. It is likely that there is some movement of the chromosomes relative to one another. But it is impossible to determine directly



Figs. 27-30 *Brassica oleracea* pollen mother-cells at metaphase II showing secondary pairing types.

Table 2. Correlation between secondary pairing in the two metaphase II plates in pollen mother-cells of *B. oleracea*

Type of Plate A	Type of Plate B							
	9(1)	1(2)+ 7(1)	2(2)+ 5(1)	3(2)+ 3(1)	4(2)+ 1(1)	1(3)+ 6(1)	1(3)+ 1(2)+4(1)	1(3)+ 2(2)+2(1)
9(1)	1	4	1			1		
1(2)+7(1)		6	11	1		1	3	
2(2)+5(1)			10	14			3	2
3(2)+3(1)				4	2		1	2
4(2)+1(1)								
1(3)+6(1)								
1(3)+1(2)+4(1)								3
1(3)+2(2)+2(1)								2
Variance	Degrees of freedom		Sum of Squares		Mean Square		Log. Mean Square	
Between pollen mother-cells	71		345.3264		4.9905		1.60756	
Within pollen mother-cells	72		148.5000		2.0625		0.72393	
	sum 143		sum 493.8264				Diff. 0.88363	

how much of such movement occurs. A correlation in the degree of secondary pairing shown by the two metaphase II plates could be taken to indicate a minimum of movement.

The split in the chromosomes becomes obvious towards the end of interphase (fig. 25), the nuclear membrane disappears and pro-metaphase II follows (fig. 26). Again the chromosomes approach one another and some become secondarily paired. Metaphase II plates (figs. 27-30) show various degrees of secondary pairing, covering the same range of types as at metaphase I, and in similar proportions. The frequencies of the different types in the three slides are recorded in Table 1. In the case of 72 pollen mother-cells, both metaphase II plates were observed in polar view. These are specially recorded in Table 2 to determine whether there is any correlation between them.

Statistical Analysis

Tests of Homogeneity

For this purpose, the data of Table 1 have been simplified in Table 3 by combining all the allegedly aberrant classes of secondary pairing, namely classes 5 to 11 of Table 1. The simplified table may then be treated as a contingency table and the contributions to χ^2 for the different degrees of freedom obtained.

Table 3. Test of homogeneity of metaphase I and II observations

Class		Metaphase I				Metaphase II				Total MI and MII
		Slide 1	Slide 2	Slide 3	Total	Slide 1	Slide 2	Slide 3	Total	
9(1)	obs. calc.	14 12.8831	7 9.8909	11 9.2260	32 27.5917	0 0.6651	3 6.1395	8 4.1953	11 15.4083	43
1(2)+ 7(1)	obs. calc.	32 41.4675	36 31.8364	35 29.6961	103 96.8917	2 2.9023	20 26.7907	26 18.3070	48 54.1083	151
2(2)+ 5(1)	obs. calc.	51 49.1169	39 37.7091	32 35.1740	122 128.3333	5 4.7163	46 43.5349	27 29.7488	78 71.6667	200
3(2)+ 3(1)	obs. calc.	41 32.2078	23 24.7273	16 23.0649	80 78.2833	4 2.5395	24 23.4419	14 16.0186	42 43.7167	122
Aber- rant	obs. calc.	17 19.3247	14 14.8364	17 13.8390	48 53.9000	2 2.1767	27 20.0930	7 13.7302	36 30.1000	84
Totals		155	119	111	385	13	120	82	215	600
		χ^2				Degrees of Freedom		Conclusion		
Within metaphase I		9.0364				8		No heterogeneity		
Within metaphase II		13.1619				8		Some heterogeneity		
Between M I and M II		5.8197				4		(P between 0.02 and 0.05) No heterogeneity		

The calculated values of m , the expected value in a perfect sample, for columns 3-5 in Table 3, viz. metaphase I frequencies for each slide, were obtained by dividing the observed marginal totals for metaphase I in column 6 between the three slides in the proportions of the total metaphase I observations for each slide, viz. the total figures at the feet of columns 3-5. The calculated values in columns 7-9 were obtained in a like manner from the totals in column 10 and the totals at the feet of columns 7-9. The calculated values in columns 6 and 10 were obtained by dividing the totals in column 11 in the proportions of the number of observations made from all three slides at each division. The contribution to χ^2 were then calculated with a minimum of labour, using the formula $\chi^2 = S \left(\frac{a^2}{m} \right) - n$; this is a transposition of the usual formula $\chi^2 = S \left(\frac{a-m^2}{m} \right)$. As shown at the foot of Table 3, there is a slight indication of heterogeneity in the metaphase II observations. The contribution of the aberrant classes to the metaphase II χ^2 is 6.8315 for 2 degrees of freedom, and lies between 0.02 and 0.05; the remaining classes therefore contribute 11.3304 for 6 degrees of freedom and P for them lies between 0.05 and 0.10, we may therefore conclude that the data in Table 3 are homogeneous and that any slight tendency to heterogeneity may be traced to the aberrant classes, a group to which some doubt already attaches for quite other reasons.

We may also make an analysis of χ^2 in the same way for the normal pairing classes alone. Table 4 shows the values of this statistic for the sources of variation important for our purpose.

Table 4. Test of homogeneity for the normal classes of secondary pairing alone.
(Cf. Table 3)

Interaction (Source of variation)	χ^2	Degrees of freedom	P
Divisions (I and II) and Secondary Pairing Types	3.7795	3	0.30-0.40
Slides (1, 2 and 3) and Types	16.1349	6	0.01-0.02 significant
Divisions, Slides and Types	3.8834	6	0.50-0.70
Totals	23.7978	15	

There is a significant difference between the slides which may be traced to the following possible causes: (1) differences in fixation leading to slight clumping in some cases; (2) differences in subjective counting of doubtful cases at different times. The latter possibility may be examined as the material on each slide was counted

over a period of several days. A test of the interaction between secondary pairing type and day of scoring failed to disclose any heterogeneity traceable to this cause.

Test of Metaphase II Correlation

We may also determine whether the degree of the secondary pairing in the two plates (cf. Table 2) at metaphase II tends to be similar. This is best done by analysing the variance into two parts between and within pollen mother-cells. This is done at the foot of Table 2. There is no question that the difference between the two mean squares is significant. The value of z is 0.44182 which is well outside the 1% probability given in Fisher's (1928) Table IV. Hence there is less variation within than between the pollen mother-cells and therefore a positive correlation between the kinds of secondary pairing in the two metaphase II plates of a pollen mother-cell. This means that the chromosomes at late interphase are not arranged at random but are influenced in their arrangement by that of the previous metaphase I. Therefore there is little movement of the chromosomes relative to one another at interphase. Such movement that does occur is probably all due to the change from the flat plate of telophase to the hollow sphere of interphase. There is little doubt that interphase, like the resting stage of mitosis, is in truth a resting stage mechanically.

Likelihood of Secondary Pairing

It has already been suggested that secondary pairing is dependent upon the bivalents lying or failing to lie in positions where they may pair at prometaphase. A parameter, the mean chance of two bivalents pairing, may be calculated from the observed frequencies in column 11 of Table 3, neglecting the aberrant classes. The aberrant classes could be included, but the meaning of the parameter estimated would be less definite and more open to doubt than that estimated in the present way. It is assumed: (1) that three pairs of bivalents are each capable of pairing secondarily; (2) that each pair has an equal chance, q , of pairing secondarily and a chance, p , of failing so to pair, such that $p + q = 1$. The frequencies of metaphase plates with 0, 1, 2 and 3 groups of secondarily paired bivalents would be given by the expansion of $(p + q)^3$, namely $p^3 + 3p^2q + 3pq^2 + q^3$. The best values of p and q may be estimated from the data by the method of maximum likelihood (cf. Mather 1936). Putting $q = 1 - p$, the logarithm (L) of the likelihood expression is

$$L = 43 \log p^3 + 151 \log 3p^2(1-p) + 200 \log 3p(1-p)^2 + 122 \log (1-p)^3.$$

This expression must be maximised; this condition will be satisfied by differentiating with respect to p and equating the differential to zero. The resulting equation

$$\frac{dL}{dp} = \frac{129}{p} + \frac{151(2-3p)}{p(1-p)} + \frac{200(1-3p)}{p(1-p)} - \frac{366}{1-p} = 0$$

may then be solved for p by successive approximation and linear interpolation (cf. Mather, 1936, p. 406). The standard error of the estimate is directly obtainable from the approximations. The values calculated are $p = 0.4077 \pm 0.0129$ and $q = 0.5923 \pm 0.0129$; the value of q is the chance that any particular secondary pair will occur.

The degree to which the total observed frequencies of secondary pairing follow a binomial distribution is estimated in Table 5, using the above values of p and q in calculating the expected numbers in each class. The value of χ^2 is 5.9640 for 2 degrees of freedom,

Table 5. Test of fit of normal secondary pairing frequencies to a binomial distribution

Type of metaphase plate	Observed numbers	Expected numbers	$\frac{a^2}{m}$
9(1)	43	34.9683	52.8765
1(2)+7(1)	151	152.4037	149.6092
2(2)+5(1)	200	221.4089	180.6612
3(2)+3(1)	122	107.2196	138.8179
Totals	516	516.0005	521.9648

$$\chi^2 = S \left(\frac{a^2}{m} \right) - n = 521.9648 - 516 = 5.9648.$$

Degrees of freedom = 2; χ^2 at 5% point = 5.991; difference barely significant.

namely four degrees of freedom less one for the total number of observations and one for the estimated parameter (p or q). The value of χ^2 at the 5% point for 2 degrees of freedom is 5.991, so the difference is barely significant. The distribution of the differences is peculiar, inasmuch as the lowest and highest values of secondary pairing are too frequent relative to the intermediate values. The mode is not displaced towards a high or lower frequency as might be expected. Errors may have crept into the observed frequencies from various sources: (1) A not inconsiderable class of aberrant metaphases have been omitted and these necessarily consist mainly of those with an intermediate degree of secondary pairing; further the omission of these aberrant classes has probably lowered the estimated value of q . (2) There is a tendency for adjacent metaphase plates to be correlated at metaphase II; presumably a similar effect holds at metaphase I. It would contribute to distortions of the normal distribution, particularly in small samples.

Discussion

On the whole the data indicate that the degree of secondary pairing closely follows a normal binomial distribution. This can be related to a simple mechanical basis.

At diakinesis, bivalents are arranged at random around the periphery of the nucleus. Each one is surrounded by a number of neighbours, the balance of the bivalents being non-neighbours. In the present instance, each bivalent is surrounded by about five other neighbour bivalents, there being three non-neighbour bivalents. Hence each bivalent has a chance, five-eighths (0.625), of lying adjacent to a similar bivalent inside the diakinesis nucleus, there being two of each kind, and therefore in a position to pair secondarily at prometaphase. This value accords remarkably well with the estimated value of q (0.5923 ± 0.0129) with which it corresponds. We may conclude that secondary pairing is solely dependent upon the diakinesis positions of bivalents relative to one another and therefore that all bivalents which lie adjacent at diakinesis and which are capable of secondary pairing are so paired at metaphase I. Similar considerations would seem to apply to interphase and metaphase II and to prophase and metaphase of mitosis.

The hypothesis is capable of test in the following manner, bearing in mind our two untested assumptions (1) that all chromosomes or bivalents repel one another equally at the end of prophase and (2) that the power of attraction between similar chromosomes (or bivalents) is equal for the whole complement. For, in certain cases, e.g. for 4, 6, 8, 12 etc. bodies (chromosomes or bivalents) it is easy to deduce theoretical late prophase (or diakinesis) arrangements of the bodies from geometrical analogies. The numbers of neighbour and non-neighbour bodies per body for several cases, are shown in Table 6, together with the values of q , the chance of two particular

Table 6. Theoretical chance of secondary pairing between two bodies in nuclei with a specified number of bodies

Number of bodies	Number of neighbours per body	Number of non-neighbours per body	Value of q , i.e. chance of two similar bodies lying adjacent
4	3	0	1.0
6	4	1	0.84
8	3 close, 3 distant	1	0.857 (maximum)
12	5	6	0.455

(i.e. similar) bodies lying adjacent. These values could be tested on suitable material.

In the absence of movement of chromosomes relative to one another during the resting stage, the late prophase pattern would

be that adopted at the previous telophase. This is important in *Drosophila*, since Kaufmann (1934) has shown that the chromosomes are somatically paired during prophase. Here the telophase pattern would be the determiner of somatic pairing.

Secondary pairing, and somatic pairing, is subject to limitation by several conditions the actions of which are by no means understood though capable of more exact study. (1) Large size of the chromosomes appears to inhibit it, since it is seen only in organisms with small chromosomes. (2) Numerical differences cause changes in frequency, high numbers of chromosomes reducing the chance of association between similar chromosomes. It would be instructive to compare somatic pairing in diploid and triploid *Drosophila*. (3) Structural dissimilarity, presumably, will weaken the attraction and may finally reach a point at which the attractive force is inadequate. Compare, for instance, the low frequency of secondary pairing in cultivated pears with its high frequency in cultivated apples (Moffett, 1934). (4) An exceptionally high force of repulsion at the centromere might inhibit pairing. (5) Inhibition of secondary pairing may be genetically controlled; no clear cases of such racial differences are yet known. In this connection, it should be possible to determine the relation between primary and secondary pairing by comparison of asynaptic with normal types.

Summary

1. Observations upon secondary pairing of bivalents at meiosis in *Brassica oleracea* ($n = 9$) suggest that this species is a secondary polyploid with a basic chromosome number of six. Three of the six basic chromosomes are present in duplicate, the other three but once each. Structural changes, inducing aberrant kinds of secondary pairing, are superimposed.

2. The course of meiosis subsequent to diakinesis is described and it is shown that there is no direct continuity between the secondary pairing present at metaphase I and metaphase II respectively, though the former tends to determine the latter.

3. The relative frequencies of different types of secondary pairing at metaphase I and II are similar. Statistical tests indicate that any heterogeneity inherent in the data lies between the different preparations examined; probably fixation can cause minor changes, especially emphasis of weak secondary pairing.

4. There is a significant correlation in type of secondary pairing between the two metaphase II plates of a pollen mother-cell. Probably no movement of the chromosomes relative to one another

occurs during interphase, except during the period when the spherical distribution of the chromosomes is being established.

5. In the normal classes of secondary pairing two similar bivalents have a mean chance, 0.5923 ± 0.0129 , of pairing secondarily. This is close in value to the chance, about 0.625, of two particular bivalents lying adjacent at diakinesis. The normal classes fit a binomial distribution fairly well.

6. We may conclude that two similar bivalents will be paired secondarily at metaphase I if they occupy adjacent positions at diakinesis. Similar data apply to interkinesis and metaphase II and to prophase and metaphase of mitosis. The mechanism, however, will always be subject to the limitations imposed by mechanical and genetical inhibitors.

Bibliography

- Alam, Zafar, 1936. Cytological studies of some Indian oleiferous Cruciferae. *Ann. Bot.* 50: 85-102.
- Catcheside, D. G., 1934. The chromosomal relationships in the swede and turnip groups of *Brassica*. *Ann. Bot.* 48: 601-633.
- Fischer, R. A., 1928. *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Kaufmann, B. P., 1934. Somatic mitosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.* 56: 125-155.
- Mather, K., 1935. The combination of data. *Ann. Eugenics* 6: 399-410.
- Moffett, A. A., 1934. Cytological studies in cultivated pears. *Genetica* 15: 511-518.
-

La genèse des "conidies" d'origine ascosporelle chez *Aleuria violacea*

par

P. Martens

Institut J. B. Carnoy, Université de Louvain (Belgique)

Introduction

Dans un article tout récent, (Bull. Soc. Myc. France, 1937), j'ai fait un relevé, aussi complet que possible, des Ascomycètes où le nombre de spores dans l'asque est *supérieur* à huit; et j'ai esquissé une étude comparative de ces cas, plus nombreux et moins bien connus que ceux où ce nombre est *inférieur* au chiffre normal. Rappelons que l'état *réellement* ou *apparemment* polysporé de l'asque peut provenir de trois phénomènes différents: 1° nouvelles mitoses des huit noyaux de l'asque, avant toute délimitation des ascospores; c'est ce que j'ai nommé la "polysporie vraie"; exemples: *Thecotheus Pelletieri* (OVERTON, 1906), *Ryparobius brunneus* (DANGEARD, 1907), *Philocopra coeruleotecta* (JOLIVETTE SAX, 1918); 2° bourgeonnement en conidies, à l'intérieur de l'asque, des huit ascospores normales; exemples: *Taphrina*, plusieurs *Nectria*, plusieurs *Tympanis* (BREFELD, 1891); 3° la dissociation, dans l'asque, de spores bi- ou pluricellulaires, chaque cellule étant capable de germer; exemples: *Hypocréa* (TULASNE, 1865; BREFELD, 1891), *Ohleria* (BERLESE, 1894), certains *Ophiobolus* (BERLESE, 1900). La littérature ne renseigne de recherches d'ordre cytologique que sur quelques cas de polysporie "vraie" et la présente étude porte sur un cas qui s'apparente, à la fois, à celui des conidies d'origine ascosporelle et à celui des dissociations d'ascospores dans l'asque. Il s'agit d'un Discomycète: *Aleuria violacea* (PERS.) GILL.¹⁾

Matériel et méthodes²⁾

Les périthèces ont été récoltés dans la forêt de Meerdael (environs de Louvain) et fixés au liquide de BENDA. J'ai utilisé comme colorants: l'hématoxyline ferrique de HEIDENHAIN, le liquide de FEULGEN, l'hématoxyline DELAFIELD et l'érythrosine, le rouge bor-

1) *Peziza*, sec. PERSOON et SEAVER (1917); *Plicaria*, sec. REHM (1897, p. 1002); *Humaria*, sec. SACCARDO (Syll., 8, 149); *Aleuria*, sec. GILLET, BOUDIER (1907, p. 45) et BRESADOLA (1933, pl. 1217, 1).

2) Ces recherches ont été effectuées avec l'aide d'instruments prêtés par le Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

deaux et l'érythrosine, le rouge-congo, l'iode ioduré (formule de Lugol), le bleu d'aniline en solution acétique diluée. Les observations n'ont été poussées qu'avec les deux premières méthodes et les figures reproduites ici ont toutes été faites d'après des préparations qui en proviennent. Les dessins ont été exécutés à la chambre claire d'ABBE, à hauteur de la table de travail, avec l'objectif apochromatique, à immersion homogène, de 2 mm. de distance focale, de ZEISS (N.A.=1.30) et l'oculaire compensateur 15×; il y a exception pour les figures 1, 12 et 18, faites avec l'oculaire compensateur 4×.

Observations

1. Après la troisième mitose de l'asque, il se délimite huit ascospores ovales uninucléées qui, rapidement, s'allongent pour devenir elliptiques, puis fusiformes (fig. 1). L'asque doit être considérée comme mûre à ce stade, les spores pouvant être libérées dans cet état et possédant déjà leur membrane propre. L'unique noyau occupe régulièrement le milieu de la cellule sporale, dans une zone de protoplasme plus dense, bordée, le plus souvent, de deux zones plus vacuolaires. On y discerne un caryosome assez gros et, dans les cas favorables, quelques petits granules chromatiques situés en périphérie (figs. 1, 2, 3).

2. L'évolution qui aboutit à la formation d'asques bourrées de centaines de conidies (fig. 18) débute par la mitose de l'unique noyau sporal (fig. 4), suivie du cloisonnement transversal de la spore en deux cellules d'égale dimension (figs. 5, 6). Peu après, une seconde mitose et un nouveau cloisonnement transversal rendent la spore quadri-cellulaire (figs. 9, 10). La seconde mitose est presque toujours simultanée dans les deux cellules composantes; j'ai relevé cependant quelques exceptions (fig. 8). En même temps, la spore subit un accroissement de taille, qui prédomine dans le sens longitudinal; accroissement sensible dès la première division et qui se poursuivra lors des divisions ultérieures (figs. 2-13).

Dès le premier cloisonnement, la spore *peut* subir, dans l'asque, une dissociation de ses deux cellules, qui poursuivront séparément leur évolution (fig. 7). On évitera de confondre ces aspects avec ceux des spores coupées par le rasoir, toujours plus ou moins obliquement lorsque l'asque est en vue longitudinale axiale (ex. fig. 1).

Les figures 4, 5, et 7 montrent que l'axe de la 1^e et de la 2^e mitose s'oriente — ou du moins peut s'orienter — perpendiculairement au grand axe de la spore, les noyaux-fils devant ensuite se déplacer avant que n'intervienne la cloison transversale. Remarque intéressante, car cette orientation est opposée à celle de l'axe de croissance future de la spore. En outre, elle ne s'accorde pas avec la "deuxième loi des

mitoses de segmentation" établie par HERTWIG; mais le désaccord, ici, est moins grand qu'il ne paraît à première vue, car il faut tenir compte du disque de protoplasme plus dense, occupé par le noyau dans la région équatoriale de la spore et bordé des deux zones vacuolaires; la zone de protoplasme "actif" a souvent, dans ces cas, sa plus grande dimension dans un sens qui est transversal pour la spore entière. On sait d'ailleurs que les exceptions à cette loi ne sont point rares. Au surplus, la rareté des figures claires de division empêche d'affirmer que cette orientation est constante; la figure 6 peut correspondre aussi bien à une mitose à fuseau longitudinal qu'à un déplacement secondaire des noyaux après une mitose à fuseau transversal.

Interviennent ensuite deux nouvelles mitoses et deux nouvelles cloisons transversales, ce qui donne six cellules à la spore totale. Ce sont généralement les deux grandes cellules du milieu qui subissent cette nouvelle division, plus rarement la cellule apicale (voir le noyau en division dans la fig. 9). Le synchronisme des deux nouvelles mitoses est moins constant que pour les précédentes: Dans la figure 14, une spore a 4 cellules, deux autres en ont cinq, dont une détachée d'elle à la pointe; d'autres spores de la même asque, plus avancées, ont déjà achevé leur évolution en conidies. L'asque de la figure 12, au contraire, sur 5 spores entières, en a 4 au stade de 6 cellules; la 1^e, la 3^e et la 4^e (comptées à partir de l'apex) sont probablement dans le même cas, mais coupées par le rasoir; la 5^e seule n'a que 5 cellules et l'une des cellules médianes, deux fois plus longue, doit être proche du cloisonnement. Cette asque ne contient aucune conidie, sauf *peut-être* une sphérule de signification douteuse à la pointe de la 4^e spore.

Une 4^e série de deux mitoses et de deux cloisons transversales peut réduire la spore à 8 cellules superposées; mais la série des cloisonnements transversaux s'arrête presque toujours au stade de 6 cellules; les quelques spores octocellulaires rencontrées étaient déjà fragmentées, en outre, en deux "demi-spores" quadri-cellulaires (fig. 13). Cette fragmentation, qui, avons-nous vu, peut dater du stade de deux cellules, est souvent plus tardive (figs. 11, 12); dans les trois longues ascospores de la figure 14, les diverses cellules sont précisément en voie de dissociation.

3. C'est normalement à partir du stade de 6 cellules superposées, — rarement plus tôt ou plus tard, — que l'évolution sporale se poursuit différemment: 1° Les noyaux subissent des divisions répétées, que ne suit plus aussi vite le cloisonnement; d'où des cellules plurinucléées (figs. 11, 13, 14). 2° Les cellules, — surtout les médianes, — deviennent plus vacuolaires (fig. 14). 3° Chaque cellule subit maintenant des cloisonnements *dans tous les sens*, l'orientation des cloisons nouvelles paraissant plus ou moins liée à la situation des vacuoles, comme on

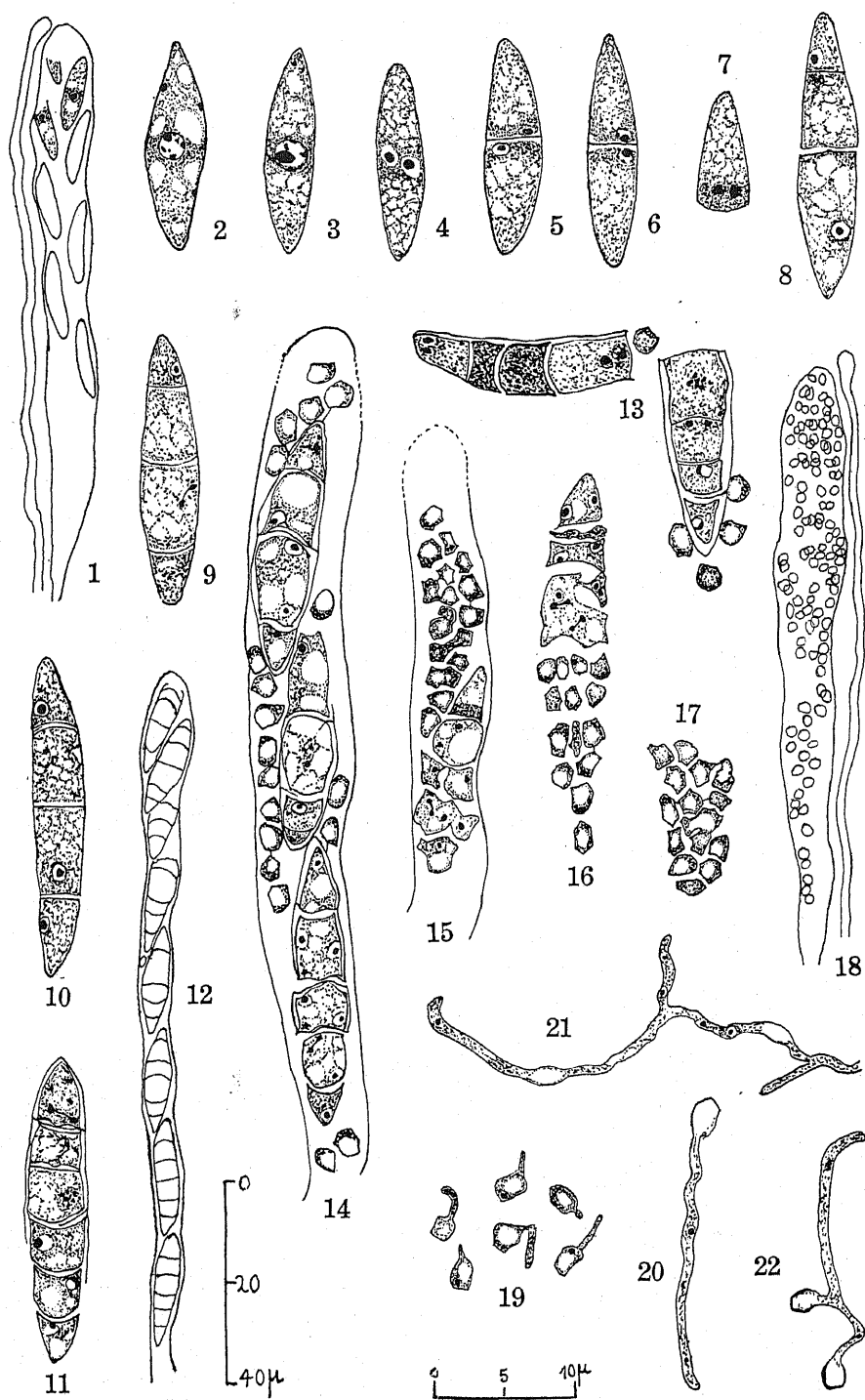
l'a déjà montré pour les filaments ascogènes (GWYNNE-VAUGHAN & WILLIAMSON, 1931) (figs. 15, 16). Ces divisions se poursuivent jusqu'à réduire chaque spore primitive en trente à quarante petites cellules polygonales ou *conidies* qui, aussitôt que produites, tendent à s'écarter les unes des autres et à se répandre librement dans l'asque (figs. 15, 16, 17, 14, 18). Il faut chercher longtemps pour trouver, deci-delà, soit pour une spore entière, soit pour une "demi-spore", un assemblage de conidies dont la forme d'ensemble et la disposition des parties trahissent encore le contour sporal primitif (figs. 15 [spore supérieure], 16 [moitié inférieure], 17).

Ici encore, le synchronisme est loin d'être parfait: La spore supérieure de la figure 15 est plus avancée que l'inférieure, et les deux moitiés de cette dernière le sont inégalement. Il en est de même des deux moitiés de la spore de la figure 16. Dans l'asque où cette dernière est dessinée, certaines spores sont moins évoluées, et d'autres entièrement réduites en conidies. La figure 14 est dans le même cas.

LÉGENDE DES FIGURES CI-CONTRE:

Coloration au FEULGEN pour les figs. 5, 9 et 10, à l'hématoxyline ferrique de HEIDENHAIN pour toutes les autres. L'échelle placée à droite de la fig. 12 vaut pour les figs. 1, 12 et 18, dessinées avec l'oculaire 4x; l'échelle placée sous la fig. 19 est valable pour toutes les autres, dessinées avec l'oculaire 15x (Grosst original: 2.500x, réduit d'1/4 par la reproduction).

Fig. 1. Asque normale, à huit ascospores uninucléées; les 3 spores supérieures sont coupées par le rasoir; à gauche, une paraphyse. Fig. 2. Ascospore uninucléée. Fig. 3. Idem. Noyau volumineux (prophase?). Fig. 4. Fin de la première mitose; comme dans les figures précédentes, les noyaux occupent une région médiane de protoplasme plus dense. Figs. 5 et 6. Premier cloisonnement transversal. Fig. 7. Moitié d'une spore, dissociée en ses deux cellules composantes; noyau divisé; comme en 4 et 5, la situation des noyaux implique une mitose à fuseau orienté transversalement. Fig. 8. Spore tricellulaire; noyau indistinct dans la cellule intermédiaire. Figs. 9 et 10. Spores quadricellulaires; en 9, noyau en haltère (télophase) dans une des cellules inférieures; noyau peu distinct (et non dessiné) dans trois autres cellules. Fig. 11. Spore à six cellules superposées, en début de dissociation dans sa partie inférieure; cellule supérieure avec 2 noyaux en télophase; deux cellules plus bas, noyau volumineux, à gros granules chromatiques (prophase?). Fig. 12. Même stade: asque entière avec ses huit spores; trois sont entamées par le rasoir (détails non figurés). Fig. 13. Deux "demi-spores", chacune à quatre cellules superposées et entourées de quelques conidies; trois cellules sont binucléées, trois sont uninucléées et l'un des noyaux paraît en division (dans la grande cellule de droite); à gauche, deux cellules fortement colorées, en dégénérescence. Fig. 14. Asque contenant trois spores de 4 ou 5 cellules en voie de dissociation et entourées de conidies provenant de spores plus évoluées; plusieurs cellules contiennent deux ou trois noyaux dont certains sont en division. Fig. 15. Asque à deux spores plus évoluées; dans la spore inférieure, nouvelles mitoses, orientées diversement, dans des cellules très vacuolisées; débuts de cloisonnements dans tous les sens; spore supérieure déjà réduite en "conidies", dont certaines sont réunies par de minces filaments apparemment "plasmodesmiques". Fig. 16. Spore dont les deux moitiés sont inégalement évoluées. Fig. 17. "Demi-spore" réduite en conidies. Fig. 18. Asque entière (avec paraphyse) remplie de conidies différenciées (détails non figurés). Fig. 19. Conidies en germination à la surface de l'hyménium; aspect de bourgeonnement dans l'une d'elles; noyau discernable dans trois autres. Figs. 20, 21, 22. Germination plus avancée; quelques noyaux discernables; en 21 (?) et 22, il semble y avoir eu anastomose entre filaments issus de deux conidies différentes.



Je ne suis jamais parvenu à mettre clairement en évidence les membranes cellulaires *communes*, évidemment très minces et fort éphémères, qui réunissent encore, avant leur séparation, les diverses cellules conidiennes. J'ai même douté de leur existence et cru d'abord qu'il y avait seulement étranglement et partage du protoplasme en plusieurs masses, par suite de la confluence des vacuoles, et formation ultérieure, libre, d'une mince paroi à la surface de chaque conidie. Il faut avouer que certains détails des figures 15 et 16, par exemple, s'accordent bien avec cette explication; rappelons que ce mode de cloisonnement a été observé ailleurs chez les Champignons (dans le sporange des Phycomycètes, par exemple) et qu'il n'est pas sans analogie avec ce que certains auteurs ont admis — contrairement à la plupart des autres — pour la délimitation des ascospores (JONES, 1926). Je ne puis cependant admettre ici ce processus, parce que la forme des conidies serait alors, dès le début, arrondie ou ovale et qu'elle est, au contraire — et très régulièrement — *polygonale*, résultat évident d'un cloisonnement authentique. Il faut donc admettre que, dans les figures 15, 16 ou 17, la mince membrane commune n'est pas discernable ou a déjà disparu. Après fixation et coloration, on voit souvent des conidies, avant leur écartement, réunies par de minces filaments colorés, apparemment "plasmodesmiques" (figs. 15, 16, 17).

Chaque conidie comporte une grande vacuole centrale et un peu de protoplasme pariétal fortement coloré, dans lequel il est rare de bien discerner un gros granule plus noir: le noyau (figs. 14-18).

Finalement l'asque ne contient plus qu'une masse informe de plusieurs centaines de conidies (fig. 18), qu'elle déverse au dehors, concurremment à d'autres asques qui libèrent des spores normales.

On peut se demander si, une fois séparées, les conidies subissent encore, dans l'asque, de nouvelles divisions qui augmenteraient leur nombre. Cette éventualité n'est pas exclue, mais aucune observation ne me porte à l'admettre et d'autres m'en détournent, notamment le maintien de la taille et de la forme polygonale des conidies jusqu'à leur libération et leur germination, ainsi que leur nombre approximatif moyen, évalué à 200-300 dans une asque pleine.

4. L'hyménium mûr est recouvert extérieurement d'une mince couche de gelée amorphe, où un bon nombre des conidies libérées sont en germination (fig. 19). Le filament germinatif produit est d'abord extrêmement étroit et il s'élargit ensuite. J'ai trouvé également *quelques* aspects de bourgeonnement. Dans les cas favorables et dans les filaments plus âgés, on distingue deux ou trois noyaux, malheureusement trop petits pour en permettre l'étude (figs. 20, 21).

Les jeunes mycéliums se ramifient tôt. Il est fréquent d'en trouver qui paraissent résulter d'anastomose entre filaments issus de

deux conidies différentes (figs. 21[?], 22). Mais l'absence d'une sériation suffisante et de toute vérification expérimentale interdit une interprétation "sexuelle" de ces aspects et d'en tirer une conclusion relative au cycle évolutif de l'espèce.

Commentaires

L'évolution qui vient d'être décrite doit être rattachée, à premier examen, à celle des "conidies" d'origine ascosporelle, observées chez d'autres Ascomycètes. J'ai montré ailleurs (1937) qu'à part quelques données fragmentaires ou suspectes de SOLLMANN (1864) et de JANOWITSCH (1865), et si l'on exclut le cas particulier des Exoascales, nous ne disposons, à ce sujet, que des observations de BREFELD (1891) et qu'aucune n'était d'ordre cytologique. Une confrontation avec nos résultats est donc ici nécessaire.

1. BREFELD observe que les conidies résultent du bourgeonnement des ascospores dans l'asque, à la façon des Levures. Chez l'*Aleuria*, aucun des stades ne montre de véritable bourgeonnement, mais bien une double série de cloisonnements, précédés de mitoses et accompagnés de phénomènes de croissance et de dissociation cellulaire. La confusion est cependant possible; on trouve fréquemment des conidies collées contre des ascospores et paraissant en provenir (figs. 13, 14). Mais un examen plus attentif démontre qu'il s'agit de conidies déjà différenciées, produites aux dépens d'une autre ascospore et adhérent à une spore moins évoluée. Ces aspects sont introuvables dans les asques où le nombre des spores entières est encore au complet. En outre, la forme des conidies produites, toujours plus ou moins polygonale, s'oppose à l'hypothèse du bourgeonnement.

2. Faut-il aller plus loin et, de cette constatation relative à l'*Aleuria*, tirer une critique de la position de BREFELD vis-à-vis des autres espèces qu'il a étudiées? On vient de voir que la confusion est aisée, par suite de l'absence de synchronisme des phénomènes dans une asque donnée. Cela paraît précisément le cas du *Nectria Coryli*, par exemple (BREFELD, pl. 4, fig. 6). D'autre part, j'ai noté déjà (1937) que le bourgeonnement levuriforme — en tant que tel — était insuffisamment prouvé par les figures de cet auteur: les seules qui l'illustrent assez clairement proviennent de spores observées, non dans l'asque, mais *isolément* et dans un milieu de culture *liquide*, ce qui rend suspect le caractère naturel du phénomène.

Certaines figures de BREFELD seraient cependant propres à répondre à la première au moins de ces objections; car on y dénombre les *huit* ascospores, outre des conidies qui déjà les entourent. Si ces

figures sont bien exactes, il est difficile d'écarter la probabilité d'un bourgeonnement – ou d'un phénomène analogue – pour *Nectria inaurata*, *Ophionectria scolecospora*, *Calosphaeria taediosa*, *Tympanis trunculata* et *pinastri* et *Coryne prasinula*. Mais les remarques qui précèdent et mes propres résultats autorisent à en exiger la vérification. Ajoutons que l'opinion de MARTIN (1925) admettant, pour le *Taphrina*, l'amitose du noyau lors du bourgeonnement, doit être écartée jusqu'à preuve contraire. Des affirmations de ce genre n'ont jamais fait, lorsqu'il s'agissait de matériel normal et sain, que traduire l'impuissance à déceler ou à mettre en évidence d'authentiques figures de mitose, impuissance que la petitesse des noyaux et d'autres difficultés techniques suffisent d'ailleurs à excuser.

S'il faut, pour l'*Aleuria*, écarter l'idée d'un bourgeonnement authentique, ne doit-on pas ramener dès lors ce cas à celui de l'*Hypocrea*, de l'*Ohleria* ou de l'*Ophiobolus*, et admettre que les cellules finales proviennent simplement de la dissociation d'ascospores pluricellulaires? On ne le pourrait qu'à condition de charger cette assimilation de nuances assez importantes.

En effet, ce ne sont pas les 2, 4, 6 ou 8 cellules d'une ascospore entière qui, comme dans les genres précités, se séparent l'une de l'autre pour donner les cellules finales, dénommées conidies. Les conidies proviennent toujours de cloisonnements nouveaux, dans tous les sens, subis par les 6 ou 8 cellules de l'ascospore, postérieurement à leur dissociation, au moins partielle; et ces 6 ou 8 cellules sont issues de premiers cloisonnements uniquement transversaux. En d'autres termes, l'origine des conidies réside dans un phénomène distinct et postérieur à celui qui amorce la dissociation de la spore en ses cellules propres; cette dissociation a lieu au stade de six, de quatre, voire de deux cellules, alors que celles qui deviendront conidiennes n'existent pas encore. La croissance, subie par la spore et les cellules sporales au cours de cette évolution, accentue encore la différence avec le cas de l'*Ohleria* ou de l'*Hypocrea*.

Cette évolution une fois reconnue, le terme "conidie", déjà discutable pour des "bourgeons", paraîtra bien peu adéquat; car il n'existe pas ici de filament ou de cellule qui serait le "conidiophore", à la fois support et producteur. Parler de "cellules sporales" n'est guère plus satisfaisant, puisque les cellules prennent naissance lorsque la spore n'a plus, en somme, d'existence individuelle. Les termes "spermaties", "spermatoids", "spermatoïde Sporen", utilisés par quelques auteurs, entraînent des confusions avec d'autres appareils reproducteurs et font trop présumer d'une "valeur", sur laquelle nous ne disposons encore d'aucun renseignement. Il serait plus logique de parler d'"oïdies ascosporales" ou "d'origine ascosporale", malgré le

caractère "reproducteur" et non "végétatif" de la formation qui en est le point de départ; car on peut faire état, à ce point de vue, des 4 ou 5 mitoses "végétatives", subies par l'ascospore unicellulaire avant l'"individualisation" des cellules reproductrices finales.

Résumé

Dans un hyménium mûr d'*Aleuria violacea* (PERS.) GILL., un certain nombre d'asques renferment plusieurs centaines de petites "conidies", capables de reproduire le mycélium (fig. 18). La genèse de ces conidies, aux dépens des huit ascospores normales (fig. 1), a été décrite en détail. L'ascospore uninucléée subit d'abord une première série de mitoses et de cloisonnements transversaux, et elle s'accroît concurremment (figs. 2-12). Les cloisonnements peuvent s'accompagner, parfois dès la première division, de la dissociation des cellules sporales (figs. 7, 13, 14). Ces dernières subissent ensuite une seconde série de mitoses et de cloisonnements *dans tous les sens*, dans un protoplasme devenu très vacuolaire, et l'orientation des cloisons nouvelles paraît liée à la situation des vacuoles (figs. 14-16). La spore primitive est finalement réduite en une trentaine ou une quarantaine de petites "conidies" polygonales, qui se séparent et se répandent dans l'asque et sont ensuite libérées (figs. 15-18). Elles germent déjà à la surface de l'hyménium, dans la mince couche de gelée amorphe qui recouvre celui-ci (figs. 19-22).

Cette évolution ne comporte aucun phénomène de bourgeonnement proprement dit, et elle ne se ramène pas non plus à une simple dissociation de spores pluricellulaires en leurs cellules composantes. Elle a été comparée avec les autres cas du même ordre et principalement avec les résultats de BREFELD.

Travaux cités ¹⁾

- Berlese, A. N. 1894-1900. *Icones fungorum.... ad usum Sylloges Saccardianae adcommodatae*. Vol. 1 & 2, Pyrenomycetes. Abellini et Patavii.
- Boudier, E. 1907. *Histoire et classification des Discomycètes d' Europe*. Paris (P. KLINCKSIEK).
- Brefeld, O. 1891. *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie*. 9-10. Ascomyceten. Münster (H. SCHÖNINGH).
- Bresadola, J. 1933. *Iconographia mycologica*. Vol. 25. Mediolani (Soc. Bot. Ital.)
- Dangeard, P. A. 1907. L'origine du périthèce chez les Ascomycètes; *Le Botaniste*, 10, 1.
- Gwynne-Vaughan, H.C.I. & Williamson, H.S. 1931. Contributions to the study of *Pyronema confluens*; *Ann. of Bot.*, 45, 355.
- Janowitsch, A. 1865. Über die Entwicklung der Fructificationsorgane von *Nectria*; *Bot. Zeitg.*, 23, 149.

1) Pour une bibliographie plus complète relative à la polysporie de l'asque, voir MARTENS, 1937.

- Jolivet Sax, H. 1918. Spore formation in *Philocopra coeruleotecta*; Amer. Journ. Bot., 5, 61.
- Jones, S. G. 1926. The development of the perithecium of *Ophiobolus graminis* Sacc.; Ann. of Bot., 40, 607.
- Martens, P. 1937. Les Ascomycètes à asques "polyspores"; Bull. Soc. Mycol. France, 52, fasc. 4.
- Martin, E. M. 1925. Cultural and morphological studies of some species of *Taphrina*; Phytopath., 15, 67.
- Overton, J. B. 1906. The morphology of the ascocarp and spore formation in the many-spored asci of *Thecotheus Pelletieri*; Bot. Gaz., 42, 450.
- Rehm, H. 1896. Ascomyceten: Hysteriaceen und Discomyceten; RABENHORST's Kryptogamen Flora, 2 Aufl., Bd. 1: Pilze, Abt. 3, Leipzig (E. KUMMER).
- Seaver, Fr. J. 1917. *Peziza proteana* and *Peziza violacea*; Mycologia, 9, 1.
- Sollmann, A. 1864. Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Sphaeriaceen; Bot. Zeitg., 22, 265.
- Tulasne, L. R. & C. 1861-65. Selecta fungorum carpologia. Parisiis (Imper-typogr.)
-

The Hydration and Dehydration Phenomena in Mitosis

By

Yoshinari Kuwada

Botanical Institute, Kyoto Imperial University

Under the heading given above I am attempting to take up in a rather fragmentary way some problems in nuclear division relating to changes in water-relation, and briefly to discuss them from the morphological point of view. The terms hydration and dehydration are used simply as denoting the changes in water-relation.

I. The Restitution Nucleus

It has been suggested in the previous paper (KUWADA, 1935) that a certain causal relation may exist between the abnormal prophasic contraction of the meiotic nucleus which has been found by ROSENBERG in one type of his restitution nuclei, and the somatic form of chromosomes appearing in the nucleus on its recovering from the contraction, a suggestion which means that the chromonema coiling for the second spiralization may be suppressed under the abnormal condition causing the nuclear contraction, so that the meiotic form of the chromosome is not realized. Such a change in the protoplasm as to cause the suppression of the chromonema coiling should also occur in the second or the typical type of the restitution, but in a later stage where the meiotic form of chromosomes has already attained to completion, and therefore, in this latter type the chromosomes are of the meiotic form. The abnormal mitoses experimentally induced by subjecting cells to abnormally high or low temperatures, by treating them with various narcotics, or by exposing them to different rays, can all be regarded as kinds of this abnormal type of mitosis. According to the results of experiments carried out by SHIGENAGA,* the direct cause beginning this type of abnormal mitosis is a dehydration taking place in the protoplasm. He has also found that the telophasic reconstruction of the nucleus or the natural unravelling of the chromonemata in spirals is primarily connected with hydration of the chromosome material. Similar results of experiments have been reported by many workers. As from the telophase to the interphase no distinct trace of swelling of the chromonemata

*) Each paper marked with an asterisk is published in the present commemoration number.

can be seen, it seems highly probable that the hydration in question is largely connected with the matrix substance of chromosomes.

In conclusion we may say: The formation of the restitution nuclei rests primarily on the arresting of the chromosome migration movement toward the poles, owing to an abnormal dehydration in the protoplasm, and secondarily on the restoration of the normal water-relation which renders the chromosomes hydrated, so that the reconstruction or the vital unravelling of the chromonema spirals results. The doubling of the chromosome number which characterizes the result from this type of abnormal mitosis is only a natural consequence of the suspension of the migration movement of the chromosomes to the poles.

II. The Heteropyknosis

The structures called karyosomes, chromocenters, prochromosomes &c. seem to represent "definite chromosomal regions which remain condensed and highly chromatic ("heteropyknotic") instead of forming portions of the reticulum" (SHARP, 1934). With improved methods of chromosome unravelling SHINKE* has succeeded in bringing some of these structures into the reticulate state in which they are no longer distinguishable from the other portion of the nucleus, and OURA has also succeeded with his own improved method (cf. OURA, 1936) in unravelling the sex-chromosomes in the resting nucleus of an insect with the same result.¹⁾

While the ordinary chromosomes which can also be unravelled experimentally (KUWADA and NAKAMURA, 1934 a), undergo the natural unravelling at telophase, the structures such as chromocenters and sex-chromosomes do not. The latter can be unravelled only artificially. The difference between these two cases, it seems, is to be sought in the difference in the degree of hydration capability of the achromatic matrix substance rather than in the nature of the chromatin (comp. I, the telophasic unravelling).

III. The Structure of the Resting Nucleus

The experiment in which we have succeeded in obtaining a structure imitating that of the normal nucleus directly from metaphasic chromosomes may be regarded as confirming the result of observation of chromosome behaviour through successive stages in mitosis; namely that the nucleus is fundamentally not more than a mass of unravelled chromonemata. OURA's success of unravelling small chromosomes with his improved method²⁾ will be able to extend

1) To be published later.

2) The investigation is in progress.

this conclusion of the chromonema structure of the nucleus much wider than our present limitation to the cases of large chromosomes. While in certain tissues this structure of the nucleus is clearly visible, in others it is obscure with intermediate grades. In our previous paper, we expressed the view that the clearness or obscureness of the nuclear structure may be determined by a change in the condition in the milieu (KUWADA and NAKAMURA, 1934 b). STROHMEYER (1935) has recently shown by experiments that the clearness or obscureness depends upon the change in the refractive index due to the hydration degree. A more extensive study on this line of inquiry is being undertaken by SHINKE, and the results hitherto obtained are briefly reported in this commemoration number. The results obtained by STROHMEYER and SHINKE very much simplify the morphological conception of the resting nucleus, and make it possible to define the term more clearly. The resting nucleus is in the morphological sense nothing more than the interphasic nucleus. Both are fundamentally of the same structure, but may have different appearances according to the hydration degree of the nuclear elements. No advance in stage is involved in the transformation of the nucleus from interphase to the metabolic stage (KUWADA and NAKAMURA, 1934 b). According to the result obtained by NAKAMURA* in his desiccation experiment of the nuclei, the polarization microscope also seems to reveal that the telophasic orientation of the chromosomes still remains, not largely altered in the resting stage. It is noted here, however, that in tissues where any further division of the nucleus does not take place, much deeper changes in structure may occur in the nuclei.

IV. The Coiling Mechanism of the Chromonemata

Now we take up the problem on the mechanism of the chromonema coiling to discuss it from the view point of the change in water-relation in the chromonemata. The present discussion is based on the idea that has developed under the suggestion of Prof. SCHMIDT in Giessen, given to me on my personal visit to him, to whom I wish to take this opportunity of thanking for his kind suggestion.

In the previous paper (KUWADA, 1935), we came to the conclusion that the chromonema spirals are formed in the co-operation of the twisting which must originate internally in the chromonemata, and of the contraction power of the chromosome matrix. In the present paper we shall discuss these questions: first, what the cause of the twisting is; secondly, how the twisting can give rise to a spiral; thirdly, whether there can in fact be found in the stage where the coiling is beginning to appear, such a condition as to cause the twisting.

1. According to SCHMIDT (1934) plant fibres are spirally twisted when they are strongly swollen by sulphuric acid. In these fibres, when observed in the intact state, the deviation from the straight extinction between crossed nicols is not demonstrable, and he concludes that in these fibres the tendency of the twisted structure must be very little in the intact state. He regards the clear display of the twisted structure by the swollen fibres as due to the intensification of the tendency by the anisotropic swelling. The chromonemata may have a certain tendency of the twisted structure, even if it is not so pronounced as to be demonstrable between crossed nicols,¹⁾ and it seems not unreasonable to assume that they may be brought to a twisted state by an anisotropic swelling. If the thread to be twisted is free at both or at one end, it will be twisted by rotation around its axis, but if fixed at both ends, it can not rotate, and is twisted with a certain number of turning points at which the direction of twisting is reversed. In the case of the chromonemata the latter case seems to be of usual occurrence rather than the former.

2. The twisting thus formed must be in a balanced state, so far as the condition brought about by the anisotropic swelling is continued. The twisting is comparable with that of a clay model. There is no force in the thread which strives to restore its original untwisted condition. When, however, the balanced state of the twisting is broken by the attainment of uniform taking in of imbibition water, the twisted chromonema will undergo untwisting just as does a thread enforced to twist by an external force on relaxation of the stress. An analogous example has been shown by RYWOSCH (1925) in the case of pods of *Caragana arborescens* put into water. The pod-halves in water are twisted into a spiral form, the distribution of imbibition water taken in being uneven, but soon they tend to become untwisted when the water has become uniformly distributed.

There are two methods of untwisting. In one method, the thread rotates around its axis in the direction opposite to that of the twisting as many times as it did on twisting. This is true untwisting. In this method, if the twisted thread has no turning point, the untwisting can not be realized when the thread is fixed at both ends. In this condition it is possible only when the thread has a turning point or points. In the second method, on the other hand, the untwisting can be realized in the case with fixed ends, and is effectuated by merely transforming the twist into spirality. The thread is completely un-

1) According to FREY (1925), even in the case where no method of observation, morphological, optical, or röntgenometrical can disclose the twisted state of a fibre, a certain degree of twisting can be recognized by the fact that the fibre rotates around the axis when a small weight is attached at one end.

twisted, if it is transformed into the spiral the number of turns of which is the same as the number of rotations of the thread when twisted. In this method of untwisting the twist is not lost, but still exists, though the thread itself is in the completely untwisted state. The spiral is merely a form of twist in which the thread has escaped from twisting. With respect to the whole length of the thread the twist still remains. This will be easily seen when a double wire-spiral is pulled out into a pair of wire-threads. In the case of the chromonemata, the rotation does not seem easily to take place through their whole length, but they have turning points, and therefore, either type of untwisting will do. If, on the other hand, there is a certain spacial limitation along the axial direction of the chromonemata such as is due to the lengthwise contraction of the matrix substance, the chromonemata will be untwisted more naturally by the second method than by the first, because the first method gives rise to lengthening of the chromonemata, the second to shortening. If in the formation of the chromonema spirals the contracting power of the matrix substance plays an important role, the untwisting must be done by the second method i.e. the method which gives rise to the formation of the spiral. This is the mechanism through which, we assume, the chromonema spiral is formed. The mere anisotropic swelling is not sufficient to produce the spirals of chromonemata in which the spiral axis and spiral turns are nearly at right angles. In the spiral of a fibre produced by anisotropic swelling the angle between the spiral axis and turns is given as 10° by SCHMIDT (1934). It may be noted here also that on spiralization the complete untwisting can not be realized, but that a certain slight degree of twisting will remain. This remaining twist will serve for the beginning of the next twisting.

OHARA's case of silk thread experimentally swollen is very interesting in regard to the spiral formation mechanism (OHARA, 1933). According to him the cocoon thread is slightly twisted, and especially in the central zone. When the thread is artificially swollen, it is considerably shortened, and the twisting or spirality becomes clear in the central zone. In the case shown in his Fig. 9 (the left hand side, vertical part of the thread) the spiral of the central zone is astonishingly regular and beautiful. In this case the spiralization is undoubtedly connected with the shortening of the cortical layers, but without an internal tendency such a regular spiral as shown in his Fig. 9 is not to be expected. In the case of chromonema spirals, the chromosome matrix perhaps acts like the cortical layers of the silk thread, protecting the chromonema from its true untwisting by its viscousness, and playing a prominent rôle in aiding spiralization

and keeping the regular form of the spiral by its contracting force. If the matrix loses this contracting power, the chromonema spirals will become irregular—the condition which we generally find in the resting nucleus. If the matrix substance undergoes a marked change and is rendered much less viscous than it is in the resting stage, the chromonemata can rotate gradually so as to untwist and come to the pulled-out state—a condition which characterizes the early stage of the meiotic prophase called the leptotene. This untwisting can take place with both ends fixed, because the spiral has turning points, and therefore, the untwisting does not give rise to the twisting around between or among neighbouring chromonemata.¹⁾

In the resting stage the chromonemata are often swollen, but here the matrix has lost its contracting power, and accordingly the swelling does not give rise to the coiling. There may be a certain doubt as to the existence of the so-called matrix (cf. MILOVIDOV, 1932). It is true that we had hitherto had no clear data from histochemical studies and staining. Recently, however, FUJII and YASUI (1936) have succeeded in the differential staining of the chromonema and the hyalonema (the matrix) with methyl blue and safranin. They (1934) have also demonstrated that the chromonema and the hyalonema differ in the degree of absorption of ultraviolet rays. According to NAKAMURA,* the so-called chromosome-negative which comes to our sight when chromosomes are treated with hot water is doubly refractive. This substance may be identified with the matrix substance.

3. We have not yet data which are full enough to discuss the third question, but shall try to make some considerations. YAMAHA (1935) has reported that in dividing pollen mother cells the pH of the karyoplasm varies in different stages. According to him, in *Lilium speciosum* (heterotype division) it is 4.35 in early prophase, 4.5 in late prophase, 4.2 in metaphase, 4.1 in anaphase, and 4.6 in telophase, and in *L. auratum* it is 4.6 in early prophase, 4.7 in late prophase, 4.2 in metaphase, 4.1 in anaphase, and 4.6 in telophase. In these plants the IEP for the karyoplasm is reported by the same author to be about at pH 3.8. Considering the matter by taking these data on pH and pHi together, we come to the conclusion that the spireme thread must be in a more hydrated state in the late prophase than in the early prophase. If this conclusion is right, we may say that the coiling of the chromonemata is associated with or preceded by its swelling, because as already discussed in the previous paper

1) A small number of twists may be produced between the neighbouring chromonemata, when the spirals have some number of turns formed by the free rotation of the end parts of the chromonemata.

the second coiling for the formation of double coiled spirals in the heterotype division must take place in a period in the late prophase.

In connection with the chromonema swelling in the late prophase, we may mention the fact that in fixed material the spiral structure is often very obscure in late prophase, while it is visible with a certain precision often in pachytene (SHINKE, 1934), perhaps in the late pachytene, or before strepsinema (SMITH, 1932). The obscureness does not necessarily mean the swelling of the chromonemata, but may be the case with the chromonemata which are swollen. The fact that in the one type of the restitution nuclei studied by ROSENBERG the chromosomes that reappear in the clear form in the nucleus restored from the abnormal prophasic contraction are of the somatic form is also significant, because the somatic form of chromosomes in the heterotype division indicates that the second coiling for the realization of the meiotic form is suppressed. According to SHIGENAGA,* the abnormal prophasic contraction of the nucleus is caused by dehydration. In the case of ROSENBERG mentioned above it seems that the second coiling is probably prevented from taking place by an abnormal dehydration, hence, the chromosomes which reappear are not usually of the somatic form.

For the first coiling which probably takes place in the later part of the early prophase, we have not yet adequate data supporting our view, but we have a certain ground which enables us to discuss the question. It has been assumed by many authors that an increase in the amount of nucleic acid takes place during the anachromatic process of the mitosis. It is a well known fact that in pollen grains the tube nuclei is erythrophile while the generative nucleus is cyanophile (COULTER and CHAMBERLAIN, 1909). According to SHINKE's experiments¹⁾ made with the precipitation method there is a marked difference in the pH_i , or pH at which IEP is found, between these two nuclei. This must, as maintained by SHINKE, show the difference in the amount of nucleic acid which each nucleus contains. The two nuclei are the sister nuclei derived from one and the same mother nucleus, and thus we are compelled to the conclusion that there must take place a certain change in the amount of nucleic acid during the kachromatic process, a change which must differ in degree between the sister nuclei. This change occurring during the kachromasis may be regarded as requiring that such a change in the opposite sense also takes place during the anachromasis. If this is true, it is expected that the pH at which IEP of the karyoplasm is found varies with the advance of the mitotic process. In the anachromatic process nucleic acid is increased in amount and correspond-

1) Unpublished.

ingly the pH_i of the chromonema should be lowered, and as a consequence the chromonemata must be in a more hydrated state than we assume it under the condition that the IEP of the karyoplasm is at pH 3.8. According to YAMAHA's results (1936) from pollen mother cells in *Lilium speciosum* and *L. auratum*, such a variation as we expected seems not to occur. His results concern, however, the chromosomes as a whole, the chromonema and the matrix substance being taken together. The latter substance should also be increased in amount during the anachromatic progress to metaphase.¹⁾ If, therefore, we consider only the chromonema separated from the matrix, it may be expected that the pH_i of the chromonema is lowered as the stage progresses, and it seems not unreasonable to assume that the chromonemata are at a certain period of prophase in a more hydrated state than in the resting stage, and that at this period the first coiling is begun. In the case of somatic mitosis too, the same will perhaps be assumed for the new coiling which takes place at the stage following the spiral stage.

4. Finally there remains the question, whether the hypothesis put forward above can harmonize with the results of observation or not.

A. *Turning points in the spiral.* a. Somatic spirals. According to the results of observation of somatic chromosomes in development, the new coiling will take place in the chromonemata in the coiled state. If, therefore, a twisting is the primary factor determining spiralization, it is expected that there will exist some number of turning points in the developed spirals. Direct observations hitherto made in respect of the direction of coiling are restricted to the case of meiotic spirals, and we have at present no data for the somatic spirals which serve sufficiently for the test of the hypothesis.

b. Meiotic spirals. By the meiotic spirals we mean those spirals found in the heterotype division and especially those which we call the double coiled spirals. The major spirals of these double coiled spirals are suitable for the observation of coiling direction, and almost all the observations hitherto made in this regard are those of the major spirals.

According to our interpretation, the major spirals are spirals that are formed primarily and the minor spirals are formed secondarily (KUWADA, 1935). The major spirals are originally small spirals like the minor spirals, but are transformed into major spirals as the minor spirals develop. During this transformation the original number of turns or gyres must be greatly reduced, but turning points

1) It may be assumed that the pH_i of the matrix substance is higher than that of the chromatin which contains nucleic acid as a main constituent substance.

may remain. The distribution of turning points observed in the major spirals may, therefore, be regarded as showing the distribution of those to be found in the original spiral primarily formed. In the meiotic prophase, unlike the somatic prophase, the chromonema spirals are pulled out into the leptotene threads before the new coiling takes place as a characteristic of this division, and therefore, the results of observation of the spirals thus formed are directly comparable with those of the plant tendril in which the realization of the spirality is largely connected with an internal structural change somewhat comparable with the anisotropic swelling.¹⁾ A brief description of the different cases of the tendril spiral has been made in the previous paper (KUWADA, 1935). A survey of literature (NEBEL, 1932; MATSUURA, 1935; IWATA, 1935) shows all the types of coils in the chromonema spirals to be comparable with the spirals of the tendril. In the former spirals, however, the case where no turning point is found or the case which is comparable with a tendril caught by spider threads at its free end has been observed to occur very frequently. This fact compels us to conclude that according to the hypothesis presented above a rotation of the chromonema threads during twisting—i.e. the rotation to take place before spiralization, hence most probably before the chiasma formation—must be admitted to take place at least to a certain extent. This rotation will perhaps not give rise to twisting around between two neighbouring sister chromosomes, because they are in this stage confined within a common matrix, and may be prevented from the twisting around by the viscosity of the latter.

The second coiling to form the minor spirals takes place in the threads which are coiled into spirals, and therefore, there must exist many turning points, but we have no observed fact which is sufficient to see whether this is actually the case or not.

B. *Double refraction of the chromonemata.* In the previous paper (KUWADA and NAKAMURA, 1934c), we have reported that in *Tradescantia reflexa* the chromonemata are doubly refractive when they are treated with certain dehydrating agents such as alcohol etc., though in the living state the double refraction is not recognizably strong. This fact may be interpreted by assuming that the orientation of the micellae which are themselves doubly refractive is rendered regular by dehydration. The assumption involves the supposition

1) In the case of tendrils the regular form of the spiral is brought about by the tension developing when both ends are fixed. When one end is free, the coiling is very loose and irregular, a state which may be comparable with the case of chromonema spirals in the resting nucleus. In the case of chromosomes this rôle of the tension is regarded as being played by the matrix substance.

that the micella orientation in the chromonemata is not regular in the living state. If, however, the chromonemata assume a twisted form as a result of swelling, it seems plausible to assume that they are of a regular structure. Recently a fact has been found by NAKAMURA,¹⁾ which seems very important in connection with the problem of the micella orientation in the chromonemata. He treated the nuclei of the staminate hairs in *Tradescantia reflexa* with liquefied carbolic acid. The nuclei (chromonemata) became doubly refractive as in the case where the material is treated with alcohol. After a lapse of time when the action of carbolic acid had progressed, however, the double refraction disappeared. When carbolic acid was replaced with water, the nuclei became again doubly refractive, and were bright between crossed nicols, but after a time they again became dark. The investigation is now in progress, and at present no conclusive statement can be made, but it seems that this can not be adequately explained only by the assumption that the recognizably strong double refraction is effected by making the orientation of the micellae regular. The fact that a mere desiccation alone is not sufficient to demonstrate the double refraction of chromosomes, but a fixation before the desiccation is necessary (NAKAMURA*), must, on the other hand, indicate that the original orientation of the micellae must be kept undisturbed in the demonstration of the double refraction. There may be another reason to explain the absence or weakness of double refraction of the chromonemata in the living state. The micella orientation may be already regular in the living state. In the present state of knowledge we have as yet no conclusive proof as to the micellar orientation in the chromonemata being irregular in the living state. In the previous paper we have reported that no marked change in the intensity of the double refraction of the chromonemata is recognizable on replacing the observing medium with fluids of different refractive indices, but this is a negative result, and now it seems necessary to subject the result to a re-investigation.

5. Concluding remark. The hypothesis presented above resembles DARLINGTON's molecular spiral theory (1935) in assuming that the spiralization is associated with the occurrence of "internal twist due to a rearrangement of the constituent particles", but differs from it, if I rightly understand it, in this point that DARLINGTON's theory assumes that the spiral "arises by an internal twisting of the thread in the opposite direction to the spiral assumed". In our spirals, the internal twisting is in the same direction as that of the spirals themselves, the twist and the spiral are only different mor-

1) Unpublished.

phological expressions of the same twisted condition. The fundamental difference between the two theories lies in the point that while the molecular spiral theory assumes the internal twist as compensating the twist due to spiralization, we consider that the compensation is effectuated by the formation of turning points which according to the molecular spiral theory need not necessarily be formed.

A double spiral formed by the external twist can give rise to two single spirals which are interlaced with each other on every level of the turns, and correspondingly, the two sister spirals formed by the longitudinal splitting of the chromonema of our spiral must be interlaced likewise. If, on the other hand, the mother spiral is formed by such a method as the molecular spiral theory assumes, the two daughter spirals are independent, and can be clearly separated from each other. These facts will be easily seen from some experiments with wire models.

We ourselves have observed in the living nucleus that the chromonemata found in the telophasic chromosomes are double (KUWADA and NAKAMURA, 1935), and the results of observation by KAUFMANN (1926), SMITH (1932), KOSHY (1933) and others show that the two spirals must be interlaced with each other on every level of the spiral turns. For these reasons it seems to me that the hypothesis here put forward is more plausible than the other.

The mechanism of chromonema coiling we assume is briefly speaking as follows: The coiling is accomplished in two steps. 1. The chromonema threads are brought to a twisted state by intensification of the internal tendency by anisotropic swelling. 2. When the imbibition water is distributed evenly, the threads are forced to untwist. The untwisting is realized by transformation of the twist into a spiral, the contracting force of the chromosome matrix playing a great rôle in this transformation, and also in bringing the spiral into the regular and compact form. When the contracting force of the matrix is lost, the spirals are rendered loose and irregular as is seen in the resting stage. The internal twisting and the contracting force of the matrix are, therefore, regarded as two inseparable factors in the formation of the regular spiral (cf. ALEXANDER and BRIDGES, 1928).

V. The Chromomere

What we intend to discuss under this heading is strictly speaking out of the scope of the present discussion, but may have a certain connection with it in the fact that the chromomeres may be visible in association with the hydration phenomenon.

According to the result we obtained,¹⁾ the transversal chromatic bands in the salivary gland chromosomes in *Chironomus* larvae are doubly refractive. It seems likely that the bands which are according to SHINKE* (cf. YASUI, 1935) positive to Feulgen's stain represent disconnected turn portions of the huge spiral of chromonemata, as reported by ALVERDES (1913) who studied the developmental history of these giant salivary gland chromosomes in this animal. According to SHINKE* the bands are transformed into a neck-lace structure when they are made to swell. The change is reversible, the neck-lace structure or a structure consisting of linear rows of granules is transformed again into the banded structure by dehydration. The appearance of the neck-lace structure due to the hydration of the bands indicates that the bands are not a structure of uniform consistency but a heterogeneous structure consisting of parts of different consistencies. The parts of the higher consistency appear as granules when those of the lower consistency disappear from sight by the hydration.

In the living staminate hair cells in mitosis of *Tradescantia reflexa* (KUWADA and NAKAMURA, 1934 b) we have observed that in the dark field illumination the telophasic nucleus appears quite dark in its early stage, but it soon comes to shine, and minute luminous granules appear in it which grow in number finally to fill up the whole nucleus. The granules are found arranged linearly or in a thready form suggesting that the chromonema may be of a granular structure. Even in the ordinary bright field we can often recognize a granular structure in the chromonemata, though it is not decidedly clear. This structure seems to be identifiable with the neck-lace structure of the chromatic bands of the salivary gland chromosome. We may, perhaps, conclude that the chromomeric structure of the chromonema can be observed only in the case where the interchromomeric substance which is probably the same substance as the chromosome matrix is hydrated to a certain extent, and especially, in the condition in which the chromonemata are straightened out (the leptotene), or, disposed loosely and irregularly coiled (the resting stage, cf. SHINKE*). In no other stages where the chromonemata are in the tightly coiled state and where the matrix substance is in a dehydrated state, do we expect to see such a structure. FUJII and YASUI (1936) state to the effect that in the heterotype division the chromomeres are visible up to the beginning of diplotene but not in later stages, the adjacent chromomeres coming in contact with one another to form a chromonema.

1) Unpublished (KUWADA and NAKAMURA).

VI. Conclusion

In mitosis water-relation is very important in order that the normal processes may take place. One of the examples to show this is the case of the telophasic chromosome unravelling, it is suspended by a hypertonic solution. It has been often reported that a prophase nucleus may show a regression towards the resting stage during the course of observation. This may be regarded as a result of chromosome unravelling or reconstruction occurring at an abnormal period, it being due to a change in water-relation caused by a stimulus given to the cells during manipulation (cf. SHIGENAGA*). Further experiments will elucidate the mechanism through which the irregular and loose spirals in the resting stage change into the regular spirals in the early prophase (spiral stage). The result of experiments on chromosomes obtained by FUJII and YASUI (1934) is very significant and important in this respect. It shows, if I rightly understand their statement, that the chromosome unravelling experimentally brought about by a hypotonic solution in which the chromosomes undergo a transformation tending toward the formation of the resting nucleus is reversible under the action of a hypertonic solution, though the authors add that the reversal may not be perfectly complete. They are of the opinion that such a reversible phenomenon may occur in the natural, normal cycle of mitosis.¹⁾ The contraction of the nuclear material such as that known as the synzesis may also be regarded as a phenomenon related to the water-relation of the nucleus. This phenomenon generally immediately follows the leptotene stage where the chromonema spirals are unravelled into threads. Both these phenomena, contraction and unravelling, are characteristics of the meiotic prophase. A series of experimental studies with changes in water-relation in view will perhaps bring some new light on the study of meiosis. There may be many problems both in mitosis and meiosis which are concerned with changes in water-relation, and it seems that investigations on this line of inquiry could clear up many morphological problems remaining hitherto obscure.

Literature Cited

- Alexander, J. and Bridges, C. B. (1928): Some Physico-Chemical Aspects of Life, Mutation and Evolution. ALEXANDER's Colloid Chemistry. Vol. 2.
Alverdes, F. (1913): Die Kerne in den Speicheldrüsen der *Chironomus*-Larve. Arch. f. Zellforsch. Bd. 9.
Coulter, J. M. and Chamberlain, C. J. (1909): Morphology of Angiosperms. New York.
Darlington, C. D. (1935): The Internal Mechanics of the Chromosomes. I. The Nuclear Cycle in *Fritillaria*. Proc. Roy. Soc., London. Ser. B. Vol. 118.

1) This is not a verbatim translation. The statement is originally more cautiously expressed, but I understand it as above.

- Frey, A. (1928): Das Wesen der Chlorzinkjodreaktion und das Problem des Faserdichroismus. *Jahrb. f. wiss. Bot.* Bd. 67.
- Fujii, K. and Yasui, K. (1934): Cell Structure and Cell Division. (Japanese). Hattori Hokokai Kenkyushoroku, I.
- and — (1936): Cell Structure and Cell Division. (Japanese). *Ibid.* II.
- Iwata, J. (1935): Chromosome Structure in *Lilium*. *Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ. Ser. B.* Vol. 10. No. 4.
- Kaufmann, B. P. (1926): Chromosome Structure and its Relation to the Chromosome Cycle. I. Somatic Mitoses in *Tradescantia pilosa*. *Amer. Jour. Bot.* Vol. 13.
- Koshy, T. K. (1933): Chromosome Studies in *Allium*. I. The Somatic Chromosomes. *Jour. Roy. Microsc. Soc.* Vol. 53.
- Kuwada, Y. (1935): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. V. A probable method of formation of the double-coiled chromonema spirals and the origin of coiling of the chromonemata into spirals. *Cytologia*. Vol. 6.
- and Nakamura, T. (1934a): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. II. Artificial unravelling of coiled chromonemata. *Ibid.* 5.
- and — (1934b): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. III. Observation of living staminate hair cells in *Tradescantia reflexa*. *Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ. Ser. B.* Vol. 9.
- and — (1934c): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. IV. Double refraction of chromosomes in *Tradescantia reflexa*. *Cytologia*. Vol. 6.
- and — (1935): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. VI. Metaphasic and anaphasic longitudinal split of chromosomes in the homotype division in pollen mother cells in *Tradescantia reflexa*. *Cytologia*. Vol. 6.
- Matsuura, H. (1935): Chromosome Studies on *Trillium kamtschaticum* PALL. II. The Direction of Coiling of the Chromonema within the First Meiotic Chromosomes in the PMC. *Jour. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ. Ser. V.* Vol. 3.
- Milovidov, P. F. (1932): Einfluß von Wasser hoher Temperatur auf den Kern der Pflanzenzellen im Lichte der Nuklealreaktion (Beitrag zur physikalischen Chemie des Zellkernes). *Protoplasma*. Bd. 17.
- Nebel, B. R. (1932): Chromosome Structure in *Tradescantia*. II. The direction of coiling of the chromonema in *Tradescantia reflexa* Raf., *T. virginica* L., *Zebrina pendula* Schnizl. and *Rhoeo discolor* Hance. *Ztschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.* Bd. 16.
- Ohara, K. (1933): Studien über den Feinbau der Seide. V. Quellungserscheinungen an Fibrinfäden. *Sci. Pap. Inst. Phys. Chem. Res.* Vol. 22.
- Oura, G. (1936): A new Method of Unravelling the Chromonema Spirals. *Ztschr. f. wiss. Mikr.* Bd. 53.
- Rywosch, S. (1925): Untersuchungen über die Quellungsvorgänge bei hygroskopischen Bewegungen. *Bioch. Ztschr.* Bd. 166.
- Schmidt, W. J. (1934): Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben. *Handb. biol. Arb.-meth., ABDERHALDEN.* Abt. V, Teil 10.
- Sharp, L. W. (1934): Introduction to Cytology. New York.
- Shinke, N. (1934): Spiral Structure of Chromosomes in Meiosis in *Sagittaria Aginashii*. *Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ. Ser. B.* Vol. 9.
- Smith, F. H. (1932): The Structure of the Somatic and Meiotic Chromosomes of *Galtonia candicans*. *Cellule*. Vol. 41.
- Strohmeyer, S. (1935): Beiträge zur experimentellen Zytologie. *Planta*, Bd. 24.
- Yamaha, G. (1935): Über die pH-Schwankung in der sich teilenden Pollenmutterzelle einiger Pflanzen. *Cytologia*. Vol. 6.
- (1936): Weitere Beiträge zur Kenntnis über den isoelektrischen Punkt pflanzlicher Protoplasten. *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku.* Sec. B. Vol. 2.
- Yasui, K. (1935): On the Structure of the Chromosome in the Salivary Gland Cell of *Drosophila melanogaster*. *Cytologia*. Vol. 6.

On the Chromosomes of Some Hemipterous Insects¹⁾

By

Seiichi Toshioka

Zoological Institute, Faculty of Agriculture,
Tokyo Imperial University

In this brief account a record is given of the chromosomes of such Pentatomid-species as *Eusarcoris* sp., *E. guttigera* Thunberg, *E. ventralis* Westwood and *E. parvus* Uhler. Those materials were mostly captured in the vicinity of Tokyo, exclusive of some specimens from Niigata, Hamamatsu and Kochi. In the genus *Eusarcoris* the testis, though slightly varying in different species, is generally of a bat-like shape as well as of a crimson colour. After vivisection it was put in Carnoy's solution with formalin as soon as possible. For staining Heidenhain's iron haematoxylin was used.

Observation

1. *Eusarcoris* sp. The species in question is that which was first named by Dr. Matsumura Marushirahoshi-kamemushi in Japanese and is of very common occurrence in Honshu, Shikoku and Kyushu. Its scientific name is not yet determined.

As is shown in Figs. 1 a-b, the spermatogonium contains 14 chromosomes of a dot-like shape and varying sizes, the member and shape being almost the same as in the other Pentatomid-species (Nishimura '27, '35; Toshioka '34, '35). Throughout the period of growth a plasmosome and two different sized chromosome-nucleoli can be demonstrated in the nucleus (Figs. 1 c, d). The nucleoli are in the beginning set apart from each other and then united into a single body. In the late diakinesis (Fig. 1 e), however, they are separated to enter the metaphase of the first spermatocyte, in which 8 dumb-bell-shaped chromosomes of varying sizes are arranged in a ring in the equatorial plate (Fig. 1 g).

In the metaphase of the secondary spermatocyte 7 chromosomes

1) This work was prosecuted at the suggestion of Dr. J. Machida to whom the author wishes to tender his hearty thanks for invaluable help and advice. His thanks are also due to Professor T. Esaki for the identification of some species, as well as to Messrs. K. Baba and E. Kawase for courteous acts in collecting the material. Here it might be mentioned that this investigation was made partly by grants from the Foundation for Promotion of Natural Sciences in the Department of Education.

are clearly demonstrated (Figs. 1 j-k). An unpaired chromosome always occupies a position at the centre of a ring made up of the other six chromosomes. In the anaphase it is divided much earlier

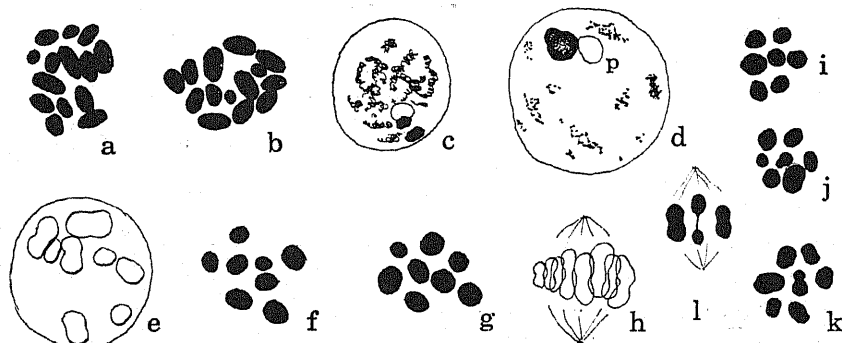


Fig. 1. *Eusarcoris* sp. a-b, spermatogonia. c-d, stages of growth period. e, diakinesis. f-g, first spermatocytes. h, first spermatocyte division (side view). i-k, second spermatocytes. l, second spermatocyte division (side view). 2000 \times . ch, chromatoid body. p, plasmosome.

than the others. Judging from these facts, it is said that the unpaired chromosome represents the X and Y chromosomes combined together; consequently it is clear that the sex-chromosomes undergo post-reduction as in other Heteropterous forms, and that the resulting spermatids are of two kinds in regard to the sex-chromosomes.

2. *Eusarcoris guttigera* Thunberg (Marushirahoshi-kamemushi). This species is said to be very common in Honshu, Shikoku and Kyushu, but efforts have been made in vain to collect it in the

vicinity of Tokyo. The specimens in hand were obtained at Kochi.

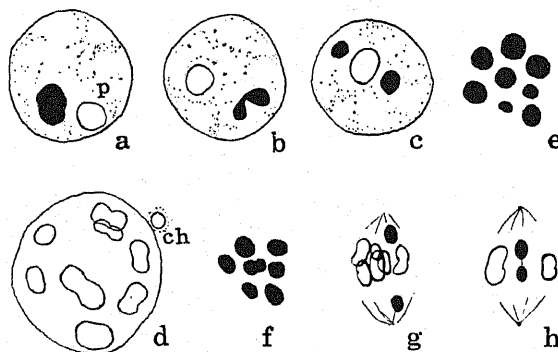


Fig. 2. *Eusarcoris guttigera* Thunberg. a-c, stages of growth period. d, diakinesis. e, first spermatocyte. f, second spermatocyte. g-h, second spermatocyte divisions side (view). 2000 \times . ch, chromatoid body. p, plasmosome.

So far as observations of spermatocytes are concerned, the first and second spermatocytes exhibit 8 and 7 chromosomes in the metaphase plate respectively (Figs. 2 e, f). Consequently it may be said that the spermatogonium possesses 14 chromosomes.

3. *Eusarcoris ventralis* Westwood (Shirahoshi-kamemushi).

The material of this species was chiefly collected in the vicinity of Tokyo.

In this species the general feature of the chromosomes closely resembles that in the preceding two. Only one fact worthy of notice is the remarkable difference in size of the sex-chromosomes (Fig. 3 i).

4. *Eusarcoris parvus* Uhler (Togeshirahoshi-kamemushi). The material of this species was collected in Tokyo and Niigata.

In this form the chromosomes present an aspect

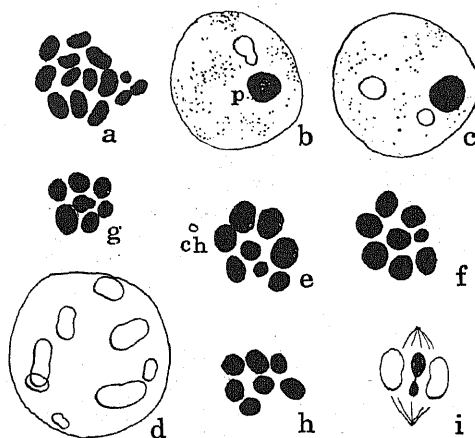


Fig. 3. *Eusarcoris ventralis* Westwood. a, spermatogonium. b-c, stages of growth period. d, diakinesis. e-f, first spermatocytes. g-h, second spermatocytes. i, second spermatocyte division (side view). 2000 \times . ch, chromatoid body. p, plasmosome.

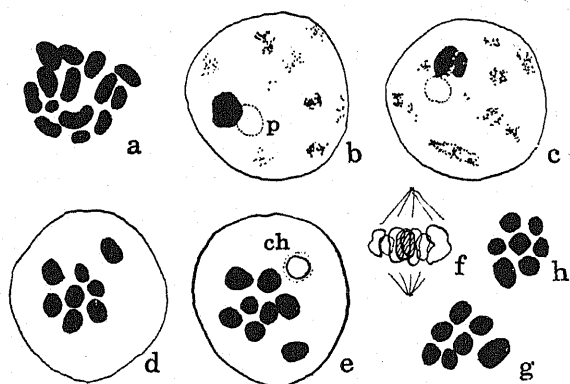


Fig. 4. *Eusarcoris parvus* Uhler. a, spermatogonium. b-c, stages of growth period. d-e, first spermatocyte. f, first spermatocyte division (side view). g-h, second spermatocytes. 2000 \times . ch, chromatoid body. p, plasmosome.

closely similar to those in the foregoing species. One peculiarity lies in the fact that in the metaphase of the first spermatocyte a chromosome is always observed to stand slightly apart from the other chromosomes arranged in a group, much as in the X chromosome in the Coreidae (Figs. 4 g, h).

Conclusion and Summary

As is evident from the facts just mentioned, the chromosomes are not only of the same number in all the species here dealt with, but the corresponding autosomes are almost similar in size. The sex-chromosomes, though being of the same type, vary considerably in the ratio of size, as already pointed out by Wilson (Pentatomidae) and Toshioka (Pentatomidae), and undergo post-reduction. Any

correlation cannot be recognized between the somatic characters and the difference in size of the sex-chromosomes.

Bibliography

1. Browne, E. N. (1916) A comparative study of the chromosomes of six species of Notonecta. Journ. Morph., Vol. 27.
 2. Nishimura, G. (1927) On the chromosomes of some Pentatomidae (Japanese). Zool. Mag. (Dobutsugaku-zasshi) Tokyo, Vol. 39.
— (1935) On the chromosomes of Pentatomidae of Manchuria (Japanese, with English résumé).
 3. Prokofiewa, A. (1933) Vergleichend-karyologische Studien von elf Arten der Familie Corixidae. Z. f. Zell. u. mikr. Anat., Bd. 19, Ht. 1.
 4. Schrader, F. (1928) Die Geschlechtschromosomen. Berlin.
 5. Toshioka, S. (1934) On the chromosomes in Hemipterous insects. II. (Japanese) Zool. Mag. (Dōbutsugaku-zasshi) (Tokyo), Vol. 46.
— (1935) On the chromosomes in Hemipterous insects. III. (Japanese) Applied Zool. Mag. (Ōyō-dōbutsugaku-zasshi) (Tokyo), Vol. 6.
 6. Wilson, E. B. (1905) Studies on chromosomes. I, II. Journ. Exp. Zool., Vol. 2.
— (1906) Studies on chromosomes. III. Ibid., Vol. 3.
— (1910) Studies on chromosomes. VI. Ibid., Vol. 9.
— (1911) Studies on chromosomes. VII. Journ. Morph., Vol. 22.
— (1925) The cell in development and heredity. 3rd ed. N. Y.
-

Zytologische Untersuchungen über die Haploidgeneration der Apocynaceen

Von

P. N. Schürhoff und H. Müller

Über die Familie der Apocynaceen liegen bisher nur vereinzelte Untersuchungen vor, deren Ergebnisse divergieren. So wurden z. B. bei mehreren Arten dreikernige Pollenkörner, bei denen also eine Teilung des Antheridiummutterzellkerns bereits im Pollenkorn stattgefunden hat, festgestellt, andererseits gab STRASBURGER (1884) für *Vinca major* zweikernige, aber für *Amsonia salicifolia* dreikernige Pollenkörner an.

Über den Typus der Tetradenteilung der Pollenkörner gehen die Angaben gleichfalls auseinander. Hier ist eine Untersuchung von FRYE und BLODGETT (1905) bei *Apocynum androsaemifolium* ausgeführt worden; auf Tafel II, Figur 8 wird eine sukzedane Teilungsfigur abgebildet. Im Text aber heißt es: „Division of the two daughter cells is simultaneous or nearly so“. Eine andere Untersuchung von TÄCKHOLM und SÖDERBERG (1918) ergab bei *Vinca minor*, daß die Tetradenteilung wahrscheinlich simultan ist. Auf Grund unserer Untersuchungen können wir an dieser Stelle schon darauf hinweisen, daß sie sukzedan ist.

Als Haploidzahl wird von FINN (1928) für *Vinca minor* und *Vinca herbacea* 23 angegeben; von SUGIURA (1931) wurde für *Lochnera rosea* die Haploidzahl 8 für *Nerium odorum* die Haploidzahl 11 aufgefunden.

Für die weibliche Haploidgeneration werden von GUIGNARD (1917) einzelliges, bei *Apocynum cannabinum* zweizelliges Archespor und vier Makrosporen angegeben, von denen die chalazale sich zum Embryosack entwickelt. Für *Apocynum androsaemifolium* geben FRYE und BLODGETT (1905) ebenfalls vier Makrosporen an, von denen entweder die chalazale oder eine andere zum Embryosack wird.

Wenn endlich noch hinzugefügt wird, daß nach BILLINGS (1901) bei *Amsonia salicifolia* und *Apocynum androsaemifolium* die Endospermibildung nach dem nuklearen Typus erfolgt, so sind hiermit die bisherigen Beobachtungen abgeschlossen.

Das Material wurde in CARNOYScher Lösung fixiert und mit Eisenhaematoxylin gefärbt. Zur Färbung der dreikernigen Pollenkörner wurde, wenn die Eisenhaematoxylinfärbung Schwierigkeiten

machte, drei Stunden in einer 1% igen Methylviolettlösung gefärbt und nach Abspülen mit Alkohol mit Nelkenöl differenziert.

Vinca minor

Das Stadium der Diakinese zeigte uns die Haploidzahl 16, während FINN die Zahl 23 angegeben hat. Wir haben daraufhin sowohl einzeln, als auch gemeinschaftlich eine größere Anzahl von Kernen nachgeprüft und können einwandfrei für die Zahl 16 einstehen. Nach der heterotypischen Teilung kommt es zur Ausbildung einer Zellwand und ebenso nach der homöotypischen, so daß also die Pollentetradenbildung nach dem sukzedanen Typus erfolgt (Fig. 1, 2 u. Mikrophoto 4). Nach Trennung der Einzelpollen findet die Bildung der Antheridiummutterzelle statt und darauf durch deren Teilung die Entstehung von 2 Spermazellen, worauf FINN schon hingewiesen hat. FINN hat solche Spermazellen auch bei den Asclepiadaceen gefunden und hält sie für ein besonderes Merkmal, das wahrscheinlich für die ganze Reihe der Contortae eigentümlich ist.

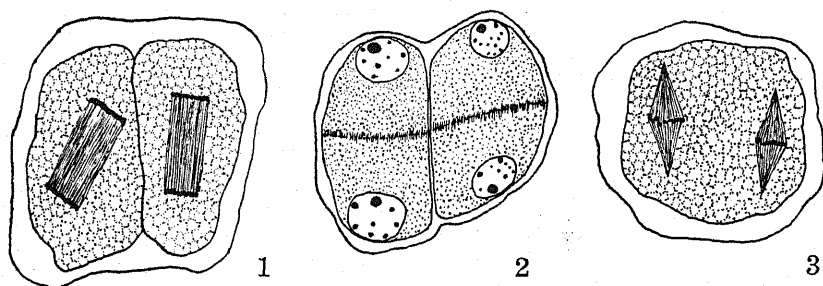


Fig. 1, 2. *Vinca minor*. 1. Telophase der heterotypischen Teilung. 2. Phragmoplastenbildung. Vergröß. 1500:1. Fig. 3. *Rhazya orientalis*. Metaphase der heterotypischen Teilung. Vergröß. 1500:1.

Die Tapetenzellen werden vor Beginn der Synapsis zweikernig, die beiden Kerne verschmelzen im Tetradenstadium der Pollen, dann erfolgt Auflösung der Zellwände und die Tapetenzellen wandern zwischen die Pollen hinein und bilden dadurch ein Tapetenperiplasmodium.

Die Samenanlage ist typisch unitegmisch, tenuinuzellat. Das Archospor ist einzellig; sehr häufig degeneriert die Samenanlage in diesem Stadium. Im anderen Falle entwickelt sich die mikropylare Makrospore weiter und bildet den achtkernigen Embryosack, dessen Antipoden sehr bald degenerieren. Nach der Befruchtung bildet sich ein nukleares Endosperm, das aber bald durch den wachsenden Embryo aufgezehrt wird.

Vinca major

Im Stadium der Diakinese konnte die Haploidzahl gut festgestellt werden; sie beträgt 8. Die Chromosomen sind etwa doppelt so dick wie bei *Vinca minor*. Auch in der Interkinese ließ sich die Haploidzahl 8 gut feststellen (Mikrophoto 5). Die Tetradenteilung der Pollenmutterzelle erfolgt gleichfalls nach dem sukzedanen Typus. Die reifen Pollen sind dreikernig, während STRASBURGER angegeben hatte, daß die Pollen von *Vinca major*, selbst nach dem Auskeimen nur zweikernig seien. Die Differenzierung der dreikernigen Pollen war allerdings bei Eisenhaematoxylinpräparaten nicht zu erreichen, doch zeigt das Mikrophoto 1, welches nach einem Methylviolettpräparat hergestellt wurde, deutlich die drei Kerne.

Die Tapetenzellen werden frühzeitig zwei- bis vierkernig, und bilden später ein Periplasmodium.

Die weibliche Haploidgeneration kennzeichnet sich durch das einzellige Archespor der unitegminaten, tenuinuzellaten Samenanlage. Aus der Archesporzelle bilden sich durch die beiden Teilungsschritte die vier Makrosporen, von denen die chalazale den Embryosack liefert. Im reifen, achtkernigen Embryosack degenerieren die Antipoden meist schon vor der Befruchtung, die Polkerne verschmelzen und nach der Befruchtung bildet sich ein nukleares Endosperm, das sehr früh von dem Embryo aufgezehrt wird, ohne daß es vorher zur Bildung von Zellwänden kommt.

Wir haben hier also bei *Vinca minor* und *Vinca major* den Fall, daß die Grundzahl der Chromosomen 8 und bei *Vinca minor* die Haploidzahl 16 ist. Da die Zellen in beiden Fällen die gleiche Größe haben, möchten wir annehmen, daß diese Verdoppelung der Chromosomen nicht durch Hinzutritt von acht neuen Chromosomen entstanden ist, sondern durch Teilung der ursprünglich 8 Chromosomen, worauf auch die doppelte Größe dieser 8 Chromosomen bei *Vinca major* hinweist.

Rhazya orientalis

Die Haploidzahl beträgt 8 (Mikrophoto 6). Im Gegensatz zu *Vinca* kommt es hier bei der Telophase der heterotypischen Teilung nicht zur Bildung einer Zellwand zwischen den beiden Tochterkernen (Fig. 3). Erst nachdem durch die homöotypische Teilung vier Kerne entstanden sind, findet die simultane Zellwandbildung statt und zwar nach dem Furchungstypus, also von außen nach innen (Mikrophoto 2).

Die Tapetenzellen werden während des Synapsisstadiums der Pollenmutterzellen zweikernig und im Anschluß hieran findet sehr schnell eine Verschmelzung beider Kerne statt, wodurch die Tapetenzellen einen großen und kräftig färbbaren Kern erhalten. Im Tetra-

denstadium der Pollenmutterzelle lösen sich die Zellwände der Tape-
tenzellen auf und die Tapetenzellen wandern in das Pollenfach
hinein und bilden ein Periplasmodium, welches allerdings sehr schnell
verbraucht wird, denn im Zweikernstadium des Pollens findet man
keine Spur des Periplasmodiums mehr vor.

Das reife Pollenkorn ist dreikernig, die Spermazellen bleiben
als solche im reifen Pollen erhalten.

Das weibliche Archespor ist einzellig, die Samenanlage uniteg-
minat, tenuinuzellat. Von den vier Makrosporen wird stets die
chalazale zum Embryosack. Die drei Antipoden des reifen Embryo-
sackes degenerieren sehr schnell, meist schon vor der Befruchtung,
die Polkerne verschmelzen vor der Befruchtung, das Endosperm
entsteht nach dem nuklearen Typus.

Amsonia tabernaemontana

Die Haploidzahl konnte im Diakinesestadium als 16 festgestellt
werden. Die Tetradenteilung der Pollenmutterzelle erfolgt nach dem
simultanen Furchungstypus. Während des Tetradenstadiums der
Pollenmutterzelle wandern die Tapetenzellen in das Antherenfach ein
und bilden ein Periplasmodium. Die reifen Pollen enthalten den
vegetativen Kern und zwei Spermazellen.

Während die Mikrosporengeneration sich im Tetradenstadium
befindet, beginnt in der Makrosporengeneration erst die Ausbildung
der einzigen Archesporzelle. Es werden vier Makrosporen gebildet,
von denen sich die chalazale zum Embryosack entwickelt. Nach der
Degeneration der Nuzellusepidermis bildet die innerste Schicht des
Integumentes ein Tapetum aus, indem sich die Zellen stark in radia-
ler Richtung in die Länge strecken. Der achtkernige Embryosack
zeigt die Verschmelzung der Polkerne vor der Befruchtung und die
Degeneration der Antipoden. Das Endosperm wird nach dem nukle-
ären Typus angelegt.

Nerium oleander

In der Diakinese der Pollenmutterzelle konnte in zahlreichen
Fällen die Haploidzahl 8 festgestellt werden. Von SUGIURA (1931)
wurde für *Nerium odorum* als Haploidzahl 11 angegeben. Wir
möchten große Zweifel hegen, daß diese Zahl richtig ist, da anderer-
seits von SUGIURA für eine andere Apocynacee, *Lochnera rosea*, die
Haploidzahl 8 angegeben wird, und nach unseren Feststellungen die
Zahl 8 als Grundzahl für die Apocynaceen anzusehen ist.

Im übrigen ist über die Pollenentwicklung zu sagen, daß nach
der heterotypischen Teilung keine Zellwand zwischen den beiden
Tochterkernen angelegt wird und erst nach der homöotypischen Teilung

lung zwischen den zunächst freiliegenden vier Kernen von außen nach innen Zellwandbildung eintritt, also auch hier der Furchungstypus vorliegt. Das reife Pollenkorn enthält auch hier den vegetativen Kern und die beiden Spermazellen. Die Tapetenzellen haben ein Periplasmodium gebildet, das ziemlich frühzeitig, nämlich schon im Stadium des noch einkernigen Pollenkorns wieder verschwindet.

Die weibliche Haploidgeneration zeigt ein einzelliges Archospor in der unitegminaten, tenuinuzellaten Samenanlage. Von den entstandenen vier Makrosporen degenerieren drei sehr bald und zwar können es hier die drei obersten, nach der Mikropyle gelagerten, oder aber die drei untersten sein, so daß entweder die mikropylare oder die chalazale sich später zum Embryosak entwickelt. Während bei der Weiterentwicklung der chalazalen Makrospore immer die oberste zuerst, dann die zweite und zuletzt die dritte degeneriert, konnten wir bei Weiterentwicklung der mikropylaren Makrospore eine derartige Reihenfolge nicht feststellen, sondern dann degenerierten die betreffenden drei Makrosporen entweder gleichzeitig oder wahllos nacheinander. Der achtkernige Embryosack zeigte normales Aussehen, die Antipoden sind sehr kurzlebig, die Polkerne verschmelzen vor der Befruchtung. Nach der Befruchtung entwickelt sich zuerst das nukleare Endosperm, während die Eizelle zunächst noch ungeteilt bleibt.

Apocynum cannabinum

Die Zahl der Pollenmutterzellen in einem Antherenfach ist bedeutend größer als bei den bisher beschriebenen Arten. Auch hier ließ sich in der Diakinese mit Sicherheit die Haploidzahl 8 feststellen. Nach der heterotypischen Teilung kommt es zwischen den beiden Tochterkernen zur Zellwandbildung. Dann folgt die Interkinese und im Anschluß daran die homöotypische Teilung, bei der gleichfalls wieder zwischen den neuen Tochterkernen ein Phragmoplast gebildet wird, der eine Zellwand anlegt (Fig.

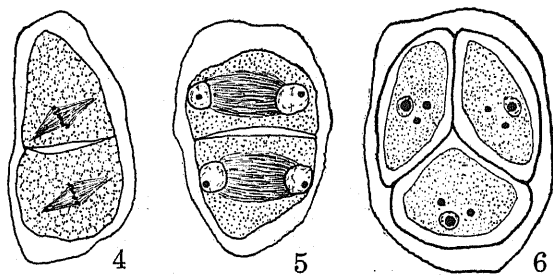


Fig. 4-6. *Apocynum cannabinum*. 4. Metaphase der heterotypischen Teilung. 5. Telophase der heterotypischen Teilung. 6. Pollentetrade; dreikerniger Pollen. Vergröß. 1500:1.

4, 5). Während bei den anderen von uns untersuchten Arten die Pollentetrade schon kurz nach ihrer Bildung in die einzelnen Pollen zerfiel, bleibt sie hier bis zur vollkommenen Reife der einzelnen Pollen

erhalten und wird auch als solche verstäubt. Schon oberflächlich konnte man sofort entscheiden, ob die Pollen der Tetrade junger oder älter waren und zwar auf Grund ihrer teilweise intensiveren Färbung und der damit bedingten schlechteren Differenzierung. Die stärkere Färbbarkeit lag an der Ausbildung der Exine der einzelnen Pollenkörner, die im Vakuolenstadium ihren Anfang nimmt. Bald wird die Exine so dick, daß sie bei der Differenzierung nicht mehr genügend entfärbt wird, so daß nur noch median geschnittene Pollen ihren Inhalt erkennen lassen. Die reifen Pollenkörner der Tetrade enthalten drei Kerne (Fig. 6).

Die Tapetenzellen werden schon zu Beginn der Synapsis vierkernig und bilden später ein Periplasmodium.

Bei der Untersuchung der weiblichen Haploidgeneration achteten wir besonders auf die Ausbildung des Nuzellus und des Integumentes. War doch bei *Apocynum*arten von GUIGNARD (1917) die Behauptung aufgestellt worden, daß der Nuzellus mit dem Integument völlig verwachse oder aber über der Archesporzelle nur eine kleine Kappe bilde. Unsere Beobachtungen ergaben, daß nur ganz junge Samenanlagen die Abgrenzung zwischen Integument und Nuzellus nicht scharf erkennen lassen. Etwa im Synapsisstadium der Embryosackmutterzelle wird die Abgrenzung jedoch deutlich sichtbar (Mikrophoto 3). Tatsächlich sind die Epidermiszellen des Nuzellus in den jüngsten Stadien gar nicht von den Zellen des Integumentes verschieden. Sie treten aber deutlich hervor, wenn schon im Zustande des zweikernigen Embryosackes die Degeneration der Nuzellusepidermis einsetzt. Die Bildung einer Kappe über der Archesporzelle, die GUIGNARD angibt, ist nur so zu deuten, daß er die Samenanlagen schräg geschnitten hat.

In jungen Stadien fanden wir neben normalen einzelligem Archespor auch häufig die Anlage zweier Archesporzellen, die entweder neben- oder untereinander angeordnet waren. Während sich die eine ohne Abgabe einer Deckzelle sehr rasch weiterentwickelte, degenerierte die andere. Im Stadium der Diakinese konnten wir auch hier 8 Chromosomen zählen. Von den vier Makrosporen liefert stets die chalazale den Embryosack. Im reifen Embryosack verschmelzen die Polkerne vor der Befruchtung und liefern nach der Befruchtung das nukleare Endosperm.

Apocynum androsaemifolium

Als Haploidzahl konnte auch hier in der Diakinese der Pollenmutterzellen die Zahl 8 festgestellt werden. Nach der heterotypischen Teilung setzt sukzedane Zellteilung ein. In der Interkinese konnte wiederum die Haploidzahl 8 bestätigt werden. Nach Aus-

bildung der Tetrade setzen die Pollenkörner im Tetradenverband ihre Weiterentwicklung fort und die reifen, dreikernigen Pollen werden im Tetradenverband verstäubt.

Die Tapetenzellen werden schon zu Beginn der Synapsis mehrkernig und im Stadium der Pollentetrade wird aus ihnen ein Periplasmodium gebildet.

Das Archespor des weiblichen Haplonten ist ein- bis zweizellig, jedoch kommt immer nur eine Archesporzelle zur Weiterentwicklung. Von den vier Makrosporen kann entweder die mikropylare oder die chalazale sich zum Embryosack entwickeln. Das Endosperm wird nach dem nuklearen Typus gebildet.

Apocynum venetum

Die Entwicklung dieser Art entspricht ganz der der beiden vorigen. Wir fanden also in der Diakinese der Pollenmutterzelle die Haploidzahl 8, nach der heterotypischen Teilung sukzedane Zellwandbildung. Die Pollen sind im reifen Zustande dreikernig und bleiben im Tetradenverband erhalten. Die Tapetenzellen bilden später ein Periplasmodium.

In der weiblichen Haploidgeneration konnten wir feststellen, daß das Archespor ein- oder zweizellig angelegt wird; nur eine Archesporzelle entwickelte sich weiter. Von den vier Makrosporen kann sich entweder die mikropylare oder die chalazale zum Embryosack entwickeln. Das Endosperm wird nach dem nuklearen Typus gebildet.

Fassen wir unsere Beobachtungen zusammen, so ist zu sagen, daß wohl kaum ein Zweifel besteht, daß für die Familie der Apocynaceen die Grundzahl für die Chromosomenzahl 8 beträgt. Diese Zahl wurde von SUGIURA für *Lochnera rosea*, von uns für *Vinca major*, *Rhazya orientalis*, *Nerium oleander*, *Apocynum cannabinum*, *Apocynum androsaemifolium* und *Apocynum venetum* gefunden. Daß aber auch die Haploidzahl 16 sich findet, konnten wir bei *Vinca minor* und *Amsonia tabernaemontana* feststellen. Da wir bei *Vinca minor* die Angabe von FINN, daß die Haploidzahl 23 betrage, richtig stellen konnten, müssen wir annehmen, daß auch seine Angabe über die gleiche Chromosomenzahl bei *Vinca herbacea* einer Korrektur bedarf. Auch die Angabe von SUGIURA die Haploidzahl von *Nerium odorum* sei 11, dürfte, nachdem wir für *Nerium oleander* die Haploidzahl mit 8 einwandfrei nachgewiesen haben, wohl kaum aufrecht zu erhalten sein.

Der Verlauf der Tetradenteilung der Pollenmutterzelle folgt entweder dem zellularen also sukzedanen Typus so bei *Vinca minor*, *Vinca major* und den drei untersuchten *Apocynum*-arten oder dem

nuklearen, simultanen Typus wie z. B. bei *Rhazya*, *Amsonia* und *Nerium*. Dies heißt also, daß hinsichtlich der Tetradenteilung bei den Apocynaceen die Entwicklung noch nicht abgeschlossen ist. Zu einer systematischen Kennzeichnung ist dieses Verhalten, ganz abgesehen von der geringen Anzahl der bisher untersuchten Arten nicht zu verwerten, da dieser Typus gerade bei nahe verwandten Arten verschieden ist, so gehören *Rhazya* und *Amsonia* mit dem simultanen Tetradentypus zu den Alstoniinae aber auch *Vinca* mit dem sukzedanen Tetradentypus. Ebenso gehört *Apocynum* mit dem sukzedanen Tetradentypus zu den Echitoideae wie *Nerium* mit simultanen Tetradentypus.

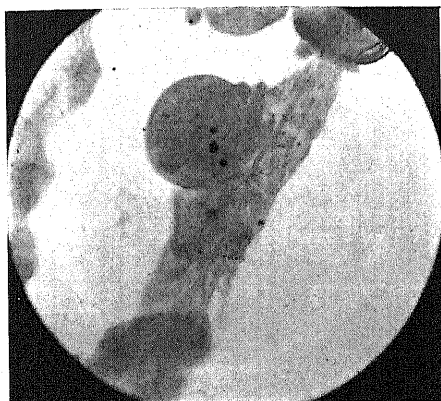
Eine besondere Progression zeigen die *Apocynum*arten, da bei ihnen Tetradenpollen ein besonderes Merkmal ist. Tetradenpollen finden sich als Charakteristikum bei den Juncaceae, Ericaceae, Empetraceae, ferner bei manchen Orchidaceae und unter Degeneration der drei anderen Makrosporen bei den Cyperaceae.

Auch die Ausbildung des Periplasmodiums, wenn diese auch streng genommen nicht zur männlichen Haploidgeneration gehört, bildet eine Progression, die gerade sehr häufig mit der Dreikernigkeit der Pollenkörner einhergeht.

Daß die Pollen dreikernig sind, dürfte für die Apocynaceen ebenfalls ein typisches Familienmerkmal sein, nachdem wir nachweisen konnten, daß die Angabe von STRASBURGER für *Vinca major* in dieser Beziehung sich als unzutreffend herausgestellt hat.

Die weibliche Haploidgeneration ist gekennzeichnet durch die unitegminate, tenuinuzellate Samenanlage. Wenn bei den untersuchten Arten der Echitoideae noch ein zweizelliges Archespor beobachtet wurde, von denen allerdings nur die eine Archesporzelle entwicklungsfähig ist, so ist dies zweifellos als Relikt aufzufassen, wie ja auch häufig bei solchen Arten, die normalerweise ein einzelliges Archespor besitzen, gelegentlich noch ein zweizelliges Archespor angelegt wird.

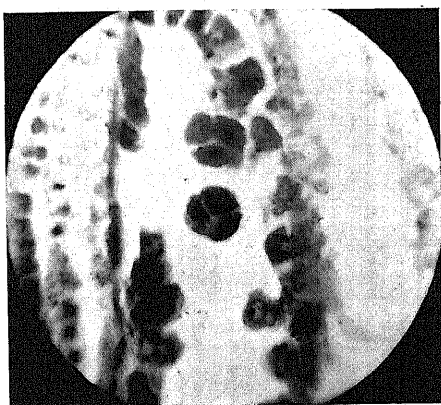
Andererseits konnten wir die Angabe von GUIGNARD (1917), daß bei *Apocynum* keine Nuzellusepidermis ausgebildet wurde, nicht bestätigen; im Gegenteil stellten wir fest, daß bei der Entwicklung des Embryosackes dieser von den degenerierenden Zellen der Nuzellusepidermis umgeben ist. Hiermit erledigen sich auch die Ausführungen von SCHNARF (1931), der die Apocynaceen zu den Pflanzen mit nackten Samenanlagen zuzählen möchte. Bemerkenswert ist ferner, daß bei einigen Arten der Apocynaceen statt der chalazalen Makrospore die mikropylare zur Entwicklung des Embryosacks verwendet wird. Ob wir hierin eine bestimmte Tendenz erblicken können, möchten wir noch nicht entscheiden.



1



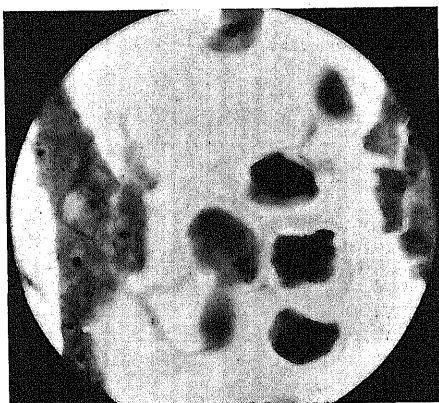
2



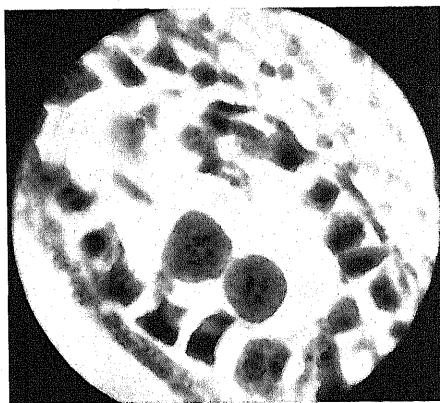
3



4



5



6

Schürhoff und Müller: Zytologische Untersuchungen über die Haploid-
generation der Apocynaceen

Eher ist vielleicht das Auftreten eines Integumenttapetums als eine allgemeine Progression, die als Merkmal eine Rolle spielt, anzusehen. Auch hier ist dieses Merkmal noch nicht allgemein durchgebildet.

Einheitlich ist die Familie endlich in der Ausbildung des nuklearen Endosperms.

Die Einteilung in die zwei Unterfamilien nach dem ENGLER'schen System läßt sich also zytologisch nur in einer Beziehung bestätigen, nämlich daß die Plumierioideae einzelliges, die Echitoideae zweizelliges Archespor besitzen.

Besonders wichtig scheint uns jedoch die Tatsache, zu sein, daß die *Apocynum*-arten Tetradenpollen besitzen; auch bei den nächstverwandten Asclepiadaceen finden wir Tetradenpollen und zwar dient er hier als wichtiges Diagnostikum, da die eine Unterfamilie (Periplocoideae) durch Tetradenpollen, die andere (Cynanchoideae) durch Pollinien gekennzeichnet ist. Vielleicht kann das Vorkommen von Tetradenpollen bei bestimmten Arten der Apocynaceen auch zu einer systematischen Gliederung führen.

Literaturverzeichnis

- Billings, F. H. Beiträge zur Kenntnis der Samenentwicklung. Flora 88. 1901.
 Finn, W. W. Spermazellen bei *Vinca minor* und *herbacea*. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 46. 1928.
 Frye, T. C. und Blodgett, E. B. A contribution to the life history of *Apocynum androsaemifolium*. Bot. Gaz. 40. 1905.
 Guignard, L. Sur le development et la structure de l'ovule chez les Apocynacees et les Asclepiadacees. C. R. ac. Paris 165. 1917a.
 Guignard, L. L'ovule chez les Apocynacees et les Asclepiadacees. Mem. ac. se inst. France 2 ser. 55. 1917b.
 Strasburger, E. Neue Untersuchungen über den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen als Grundlage für eine Theorie der Zeugung. 1884.
 Sugiura, T. A list of chromosome numbers in Angiospermous plants. Bot. Mag. (Tokyo) 45. 1931.
 Täckholm, G. und Söderberg, E. Neue Beispiele der simultanen und sukzessiven Wandbildung in den Pollenmutterzellen. Sv. bot. Tidskr. 12. 1918.

Erklärung der Tafel 12

1-6: Mikrophotographien.

1. *Vinca major*: Dreikerniger Pollen.
2. *Apocynum cannabinum*: E.M.Z. Synapsis; Integument und Nuzellus sichtbar.
3. *Rhazya orientalis*: Pollentetraden; Periplasmodium.
4. *Vinca minor*: Interkinese, sukzedane Wandbildung.
5. *Vinca major*: Interkinese.
6. *Rhazya orientalis*: Interkinese.

On the Spermatozoid of *Ginkgo biloba* *

By

Tamaki Shimamura
Tokyo Imperial University

(With 2 Plates and 4 Text-figures)

It was in 1896 that Hirase for the first time observed living spermatozoids of *Ginkgo* coming out from the pollen tube. The study of living *Ginkgo* spermatozoids has been carried out in detail by Fujii (1898, 1899, 1900), Ikeno (1899), Miyake (1898, 1902) and Bessey (1901).

In his second paper, in 1899, Fujii gave a most valuable description of living spermatozoids and the methods by which they emerge from the pollen tubes in sugar solutions.

Forty years have already elapsed since the spermatozoids of *Ginkgo* were discovered, yet to the knowledge of the writer the references in the literature to the living spermatozoid of *Ginkgo* still remain those given above. It is the object of the present account to reexamine the morphology of spermatozoids and to describe some additional facts in regard to fertilization.

Description

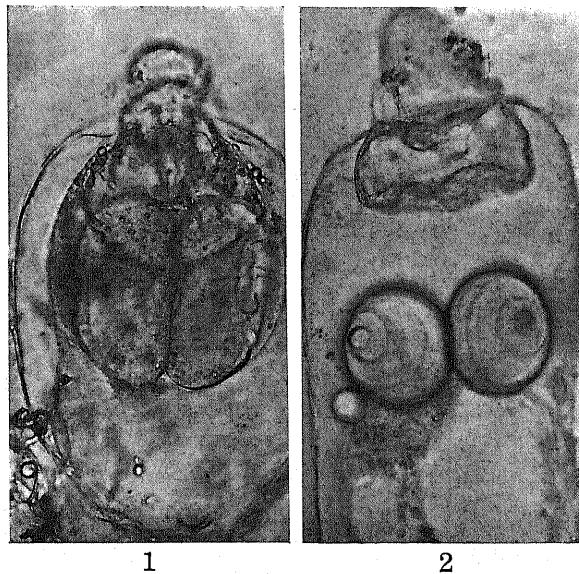
Two mature spermatozoids before they start to swim are lying side by side within the common wall of the mother cell. In the present case the mother cell means Hirase's "Körperzelle" i.e. body cell, because the whole contents of the body cell is transformed into two spermatozoids (Text-fig. 1). The presence of this cell wall can be observed more definitely after the spermatozoids come out in the pollen tube from the mother cell as in Text-fig. 2. Fujii (1899) and Miyake (1898) have already described this cell wall. Miyake (1902) states "It is interesting to note that this wall have not been found either in *Cycas* or *Zamia*".

In *Dioon edule* and *Ceratozamia*, Chamberlain (1909, 1912) observes that two sperms are formed within the two sperm mother cells, resulting from the division of the body cell. In the case of *Ginkgo* there is no wall between the spermatozoids. This fact affords a proof that two spermatozoids are developed in a common old cell membrane of the mother cell.

* Contributions from the Divisions of Plant-Morphology and of Genetics, Botanical Institute, Faculty of Science, Tokyo Imperial University, No. 177.

The nucleus which occupies the greater part of the whole body is more hyaline than the surrounding cytoplasmic portion which is granular in appearance. The spiral band makes the indentation which forms a deep helicoid furrow on the outside of the spermatozoid body and moreover the spiral band as a whole is largely pressing on the nucleus, showing that the latter is of a fluid nature (Text-fig. 1).

On a section of fixed and stained spermatozoid in the mother cell a similar observation may be clearly made (Pl. 13, Fig. 5). Hirase (1898) explains the indentation with his fixed material as follows "trois tours de spire qui sont séparés les uns des autres par des canaux". Thus the cytoplasmic sheath of the spiral band takes a compressed form when the spermatozoids are enclosed in the mother cell (Text-fig. 4). So



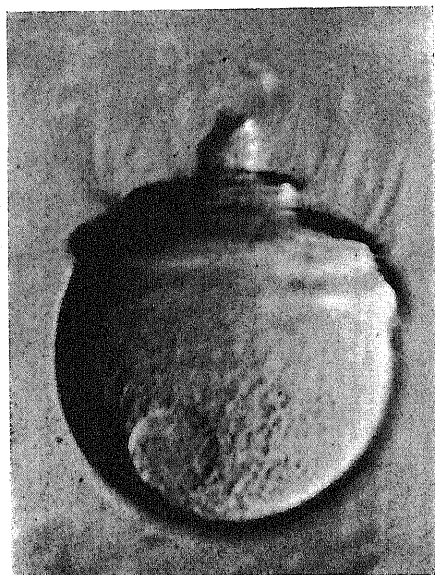
Text-figs. 1 and 2. The pollen tube of *Ginkgo* in 10% cane sugar solution: 1. Living spermatozoids in the mother cell. $\times 300$. 2. Spermatozoids swimming freely in the pollen tube. $\times 250$.

long as the two spermatozoids are still enclosed in the mother cell they can, by gently vibrating their cilia and moving the parts of their bodies, change their relative positions inside the mother cell.

When the spermatozoids come out into the wider chamber of the pollen tube, breaking the wall of the mother cell, all of the cilia are soon vibrating so rapidly that they can hardly be seen.

They rotate on the long axis of their body (around an axis passing through the apex of the helicoid spiral) move forward with the spiral band leading, pull apart from each other and twist up (Text-fig. 2, Pl. 13, Fig. 1). In Text-fig. 2 the spiral bands of two spermatozoids are shown turning toward the observer. Close to the spermatozoid on the left hand side a little spherical body is seen. That is a part of cytoplasm which was separated from the spermatozoid as a result of injury. Such a cytoplasmic portion

usually takes on a spherical shape showing that it is of a liquid nature. Fujii (1900) noticed that the injured spermatozoid left the



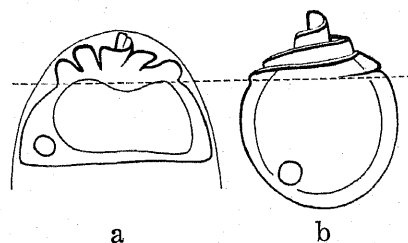
Text-fig. 3. Mature spermatozoid while swimming freely. $\times 600$.

cytoplasmic portion, and that then such an injured spermatozoid continued to swim as if it had been uninjured. He compared this phenomenon with the case of the lower type of organism which has an undifferentiated organ, or with the spermatozoids of ferns which often leave the cytoplasmic fragment. In the present case a similar phenomenon is indicated, for the injured spermatozoid was able to swim for nearly half an hour.

The form of spermatozoids when swimming free in cane sugar solution (10%) is somewhat like the shape of the fruit of an egg-plant or the mature *Ginkgo* ovule. In Text-fig. 3 there is shown a shape which is

more spherical than that in the figures of the previous investigation. According to Miyake "the size seems to vary from about $110\ \mu$ to $80\ \mu$ in length, and from $50\ \mu$ to $85\ \mu$ in width". That of Text-fig. 3 is about $90\ \mu \times 72\ \mu$ in size. The spiral band which is compressed on the apex of the body when it is enclosed in the mother cell wall, now expands showing a somewhat cone-like shape. The width of the spiral band is distinctly broadest at the apical end and gradually decreases, finally fading out entirely at the open end (Text-figs. 3, 4). Viewed from the head or apex of the

spiral, the direction of the turns of the spiral band is left to right that is to say in the direction of the hands of a clock (Pl. 13, Figs. 1, 4). A total of two and a half turns seems to be a correct estimate. On the external margin of the spiral band there exists a well stained



Text-fig. 4. Diagrams of spiral band of the spermatozoid. a. Compressed form which is seen while the spermatozoid is enclosed in the mother cell wall. b. Expanded spiral band which is seen when the spermatozoid is swimming freely.

line (fixed and stained with Heidenhain's iron-haematoxylin), from which numerous cilia are developed (Pl. 13, Figs. 4, 5, 6).

The nucleus of the swimming spermatozoid is transparent and occupies a larger portion of the whole body. The surrounding cytoplasmic part is more granular and contains an oil-like globule of unknown nature. With regards to this globule Hirase (1898 p. 130) states this is a nutritive substance which will be brought into the egg cell. Herzfeld (1927 p. 826) names it as „extranukleären Nukleolen“ stating „Die ausgestossenen extranukleären Nukleolen sowie ihre Umgebung scheinen Exkretionen des spermatogenen Kerns zu sein, die dem Untergang geweiht sind“. Schnarf (1933) throws doubt upon the reason as to why two globules appear, occupying a strictly symmetrical position on both sides of the nucleus of the body cell, and why after the nuclear division each of them is transferred into a spermatozoid. The function of this globule is as yet unknown.

With the exertion of a slight pressure, the body of the spermatozoid may change its form, but being soft and very elastic, it recovers its shape once the pressure is removed. Fujii (1899) gives the following description as regards the methods by which the spermatozooids get out of the pollen tube, namely; in general there are two methods, (a) gradual egress, and (b) sudden egress and the factor chiefly responsible for the occurrence of one method or the other is the density of the surrounding fluid.

(a) Mode of gradual egress. In Fujii's Fig. 4 an example is shown, where the head of the spermatozoid appeared a little way out of the pollen tube and according to his description the spermatozoid emerged entirely from the tube after five minutes and recovered its normal shape.

Exactly similar behavior of the spermatozoid has fortunately been observed by the writer. In Fig. 2 the whole of the spiral band has already resumed its normal form, and the cilia are vibrating very vigorously, while the main part of the body still remains inside the tube so that the whole body takes on an appearance like that of a silkworm cocoon. Once the body was definitely escaped it soon takes on a normal shape, the constriction in the middle part of the body being no longer visible (Fig. 3). From this observation it can be seen how soft and elastic the body is. Another remarkable example of a gradual egress of the spermatozoid is demonstrated with photographs in Pl. 14, Figs. 10-15. In this case the base or the side of the spermatozoid body stretches considerably so that it slips through the narrow opening out of the tube. It is noteworthy that under such conditions the spiral band as a whole gives the impression of being solid, retaining its normal shape, while the rest of the body takes on

the appearance of a liquid apparently enclosed in a thin plasma membrane. The cilia vibrate regardless of however the body of the spermatozoid may be deformed (Fig. 10). It may in any case be recognized that the cytoplasmic sheath which constitutes the spiral band has different physical properties, if one compares it with the cytoplasm surrounding the nucleus. One side of the spiral band turns toward the outside of the tube, and the spherical part of the body increases in size (Fig. 11). Then the spiral band as a whole appears out of the tube extending somewhat while retaining its original form, and one end still remains in the tube while the other side contacts with the spherical shaped body. By comparing such a deformed spermatozoid with another spermatozoid swimming in the pollen tube, it can be easily understood how flexible the whole body is and how eminently it is fitted for its difficult task of finding and swimming through the narrow passage between the neck cells of the archegonia (Fig. 12). When the spiral band comes away from the wall of the pollen tube, the spermatozoid completely recovers its normal form while the vibration of the cilia continues very actively (Fig. 13). By continuous rotation of the body at a constant speed the spermatozooids roll around, first here, then there like a large infusoria (Figs. 14, 15).

(b) Mode of sudden egress. According to Fujii (1899) in this case the membrane of the mother cell containing the two spermatozooids is suddenly thrust out of the pollen tube. At first the shape of the spermatozoid is very irregular because of the surrounding pressure produced by sudden protrusion, but gradually it separates from the mother cell and finally takes on its complete form, like the fruit of an egg plant. Meanwhile it gently begins to swim at a definite speed. This fact also shows how soft and elastic it is. The writer has twice been able to observe such a mode of escape, where the spermatozoid which is irregularly shaped soon recovers its complete form as described by Fujii.

When the spermatozooids are discharged in the archegonial chamber it is not hard to suppose that they swim to the neck cell and continue to gradually revolve around and around. The entire spermatozoid swims into the receptive cavity, the existence of which is maintained by Hirase (1918) and the writer (1928), passing between the ruptured neck cells. The entrance of the receptive cavity is very small and narrow compared with the size of the spermatozoid, and the latter must be greatly stretched out so that it assumes a very long, slender form, during its passage through this entrance. The spermatozoid has need of all the elasticity possible, as is indicated also in the case of gradual escape from the pollen tube. It is certain

that the entire spermatozoid is capable of passing without injury through the narrow entrance canal between the neck cells into the receptive cavity, as the spermatozoid of normal shape has been found in many instances in the receptive cavity.

Frequently two spermatozoids are found in the receptive cavity of which only one takes part in fertilization while the other may be found presenting a normal appearance or in some stage of disintegration. So far as the cases observed are concerned, the head or apical end of the spermatozoid which reaches the egg cytoplasm becomes attached to the latter. The escape of the nucleus from the body is shown in Pl. 14, Figs. 7-9. The male nucleus slips out of its cytoplasmic sheath and passes on alone through the egg cytoplasm to the female nucleus. The ciliferous band includes a well stained line, which as already stated remains near the boundary of the egg cytoplasm. Thus the function of the spiral band of the spermatozoid certainly ends with the transporting of the male nucleus from the pollen tube to the egg cell. The cilia and cytoplasm remain meanwhile as the residual substance, which ultimately disappears.

Summary

1. The whole contents of the body cell of *Ginkgo* is transformed into two spermatozoids. Between the two spermatozoids there is no cell wall when they are formed, however they are surrounded by a common wall.
2. So long as the spermatozoids are still enclosed in the mother cell the cytoplasmic sheath of the spiral band takes on a compressed form.
3. The swimming spermatozoid has an expanded spiral band, which is distinctly broadest in width at the apical end and gradually decreases finally fading out entirely.
4. Several methods by which the spermatozoids get out of the pollen tube in sugar solutions are described.
5. The body of the spermatozoid is soft and elastic, so that as a result of a slight pressure it may change its form, but it recovers its shape again after the pressure is removed.
6. The cytoplasmic sheath of the spiral band only may be of a comparatively solid nature, whereas the remaining parts of the body, which are surrounded by the plasma membrane are of a highly liquid nature.
7. The entire spermatozoid is found in the receptive cavity. This fact proves that the spermatozoid passes without injury through the narrow opening or canal between the neck cells.

8. The male nucleus slips out of its cytoplasmic sheath, then travels on alone and fuses with the egg nucleus, while the cilia bearing cytoplasmic sheath is left near the boundary of the egg cytoplasm.

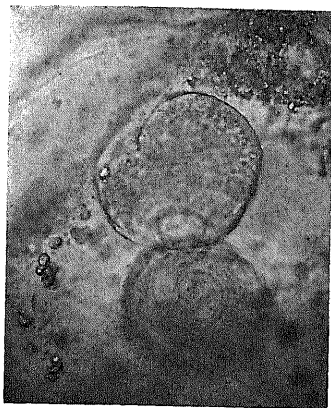
Botanical Institute, Faculty of
Science, Tokyo Imp. University

Literature

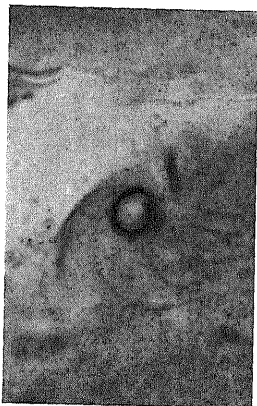
- Bessey, E. A. 1901. Notes on the spermatozoid of *Ginkgo*. *Science* 13: 255.
 Chamberlain, C. J. 1909. Spermatogenesis in *Dioon edule*. *Bot. Gaz.* 47: 215-236.
 — 1912. Morphology of *Ceratozamia*. *Bot. Gaz.* 53: 1-19.
 Fujii, K. 1898. Has the spermatozoid of *Ginkgo* a tail or not? *Bot. Mag. (Tokyo)* 12: 287-297 (Japanese).
 — 1898. Remarks on Mr. Ikeno's remarks on my views regarding the morphology of the pollen-cells and the spermatozoid of *Ginkgo*. *ibid.* 13: 69-73 (Japanese).
 — 1899. On the morphology of the spermatozoid of *Ginkgo biloba* (Preliminary note) *ibid.* 13: 260-266 (Japanese, with the explanation of plate in English).
 — 1900. Account of a sperm with two spiral bands (On bicephalous spermatozoid of *Ginkgo*). *ibid.* 14: 16-17 (Japanese report of the meeting of the Tokyo Botanical Society).
 Herzfeld, St. 1927. Beiträge zur Kenntnis von *Ginkgo*. *Jb. f. wiss. Bot.* 66: 814-862.
 Hirasé, S. 1896. On the spermatozoid of *Ginkgo biloba*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 10: 325-328 (Japanese).
 — 1898. Étude sur la fécondation et l'embryogenie du *Ginkgo biloba*. *Seconde mémoire. Jour. Coll. Sci., Imp. Univ. Tokyo* 12: 103-149.
 — 1918. Nouvelles recherches sur la fécondation et l'embryogénie du *Ginkgo biloba*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 32: 139-143.
 Ikeno, S. 1898. Notes on the spermatozoid and pollen-tube of *Ginkgo biloba* and of *Cycas revoluta*. *ibid.* 13: 31-34 (Japanese).
 — 1901. Contribution à l'étude de la fécondation chez le *Ginkgo biloba*. *Ann. des Sci. nat. Bot. Serie* 8: 303-319.
 Miyake, K. 1898. On the spermatozoid of *Ginkgo biloba*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 12: 333-339 (Japanese).
 — 1902. The spermatozoid of *Ginkgo*. *Jour. Applied. Micro. and Lab. Methods* 5: 1773-1780. Rochester. New York.
 Schnarf, K. 1933. Embryologie der Gymnospermen. *Handb. d. Pflanzenanatomie* II Abt. 2 Teil. Berlin.
 Shimamura, T. 1928. On the formation of proembryo of *Ginkgo biloba* L. *Bot. Mag. (Tokyo)* 42: 71-76.
 — 1935. Über die Bestäubung und Befruchtung bei *Ginkgo biloba* L. *Jap. Jour. Genet.* 11: 180-184.
 — 1935. Zur Cytologie des Befruchtungsvorganges bei *Cycas* und *Ginkgo* unter Benutzung des Feulgenschen Nuclearreaktion. *Cytologia* 6: 465-473.
 Webber, H. J. 1901. Spermatogenesis and fecundation of *Zamia*. U. S. Dept. Agric., Bur. Pl. Ind. Bull. 2. Washington.

Explanation of Plates

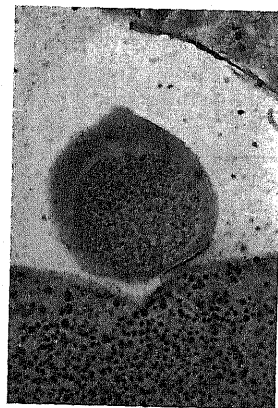
All figures are photomicrographs taken with Agfa Isochrom plates by using Wratten B filter. For photomicrographs 1-3, 10-15 Leitz achromatic objective 4 and Zeiss comp. ocular 10 were used. For photomicrographs 4-6 Leitz oil imm. objective 1/12 and Zeiss comp. ocular 8 were used. For photomicrographs 7-9 Leitz oil imm. objective 1/12 and periplane ocular 4 were used. Figs. 4-9. The preparations were fixed with Bouin's fluid and stained with Heidenhain's iron-alum haematoxylin.



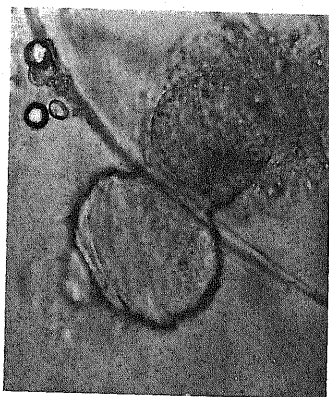
1



4



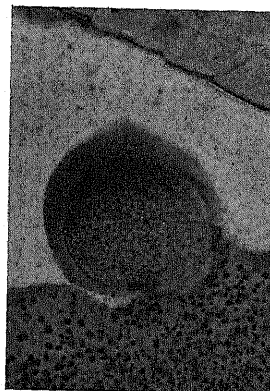
7



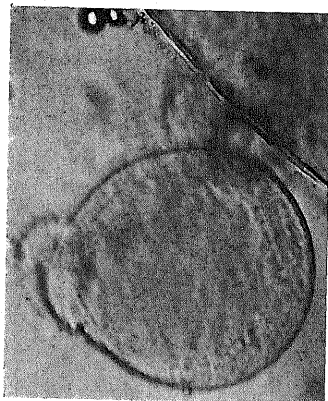
2



5



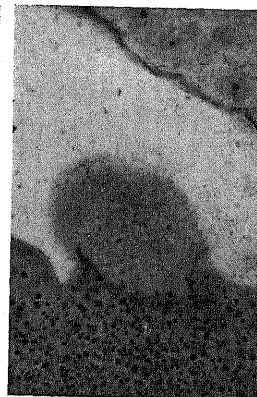
8



3

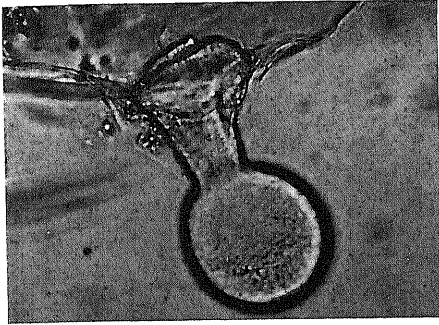


6

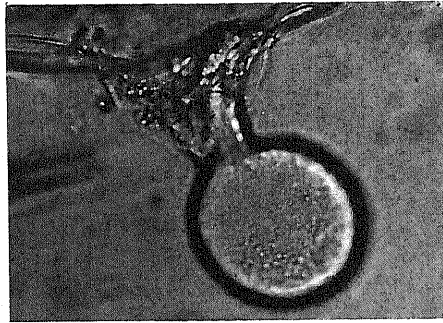


9

Shimamura: On the Spermatozoid of *Ginkgo biloba*



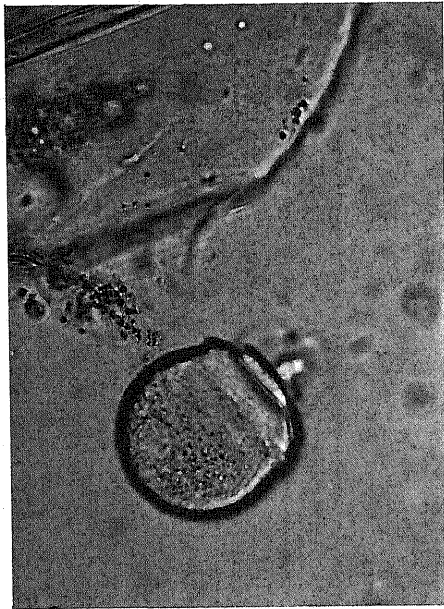
10



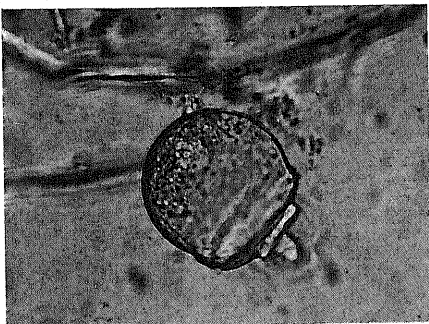
11



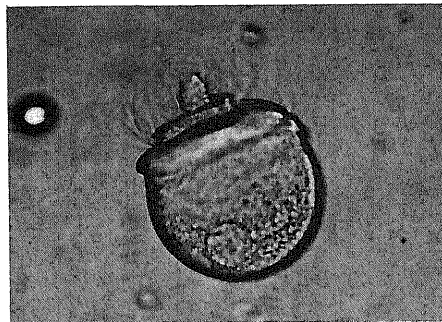
12



13



14



15

Shimamura: On the Spermatozoid of *Ginkgo biloba*

Plate 13

- Fig. 1. Mature spermatozooids swimming in the pollen tube.
Fig. 2. A spermatozoid is just escaping through a narrow opening out of the pollen tube.
Fig. 3. The same spermatozoid as in Fig. 2. It recovers the body shape at the outside of the pollen tube.
Fig. 4. Apical end of the spiral band viewed from the head.
Figs. 5-6. Two oblique sections of the spermatozoid which is still enclosed in the mother cell, showing the compressed spiral band on the apex of the body.
Figs. 7-9. Three consecutive sections of the spermatozoid in the receptive cavity. The apex of the spermatozoid touches the egg cytoplasm. The nucleus slips out of the cytoplasmic sheath, while the spiral band is left behind.

Plate 14

- Figs. 10-15. Series of the behaviour of one spermatozoid which is escaping out of the pollen tube, showing how the spermatozoid body is stretched and deformed and how it recovers the normal shape. In Fig. 12 (a lower magnification than others) one of the two spermatozooids is seen outside and the other still inside the pollen tube.
-

Die Arbeitsräume in den Darmzellen von *Ascaris*; die Einwirkung des Hungerns; die Sekretbildung

Von

Gottwalt Christian Hirsch und L. H. Bretschneider

Aus der Abt. f. exper. Morphologie des Zool. Labor., Utrecht, Holland
(Leiter: G. C. Hirsch)

Fragestellung

Der Darm von *Ascaris* unterscheidet sich dadurch von dem Darmbau vieler anderer Tiere, daß er beinahe nur aus gleichmäßig gebauten Zellen besteht; eine Differenzierung oder Arbeitsteilung unter den Darmzellen ist vorläufig noch nicht zu beobachten. Es müssen demnach die drei großen Funktionen der Darmzellen aller Tiere bei *Ascaris* in jeder Zelle zusammen vorhanden sein: Sekretion, Resorption und intraplasmatische Verarbeitung kommen offenbar in jeder einzelnen Darmzelle vor. Dies läßt zunächst die Frage entstehen, wie denn in einer einzigen Zelle diese drei Funktionen miteinander geordnet sind: räumlich und zeitlich.

Zweitens eignet sich der *Ascaris*darm durch die Größe seiner Zellen besonders gut zur Untersuchung intraplasmatischer Vorgänge. Diese sind in der Darmzelle von *Ascaris* aber recht kompliziert. Will man sie näher untersuchen, so ist es notwendig, über die rein statische Beschreibung hinaus zu gehen zur Erforschung der Dynamik der Vorgänge in der Zelle selbst; dies kann aber nur dadurch geschehen, daß man die Zelle arbeiten läßt und sie während dieser Arbeit langdauernd beobachtet.

Hier folgen zunächst einige vorläufige Angaben über den statischen Bau der Zelle, über die Einwirkung des Hungerns und über die Sekretbildung (ohne auf Literaturangaben einzugehen).

Technik

Nur einige kurze Bemerkungen noch über die Technik (eine genauere Darstellung folgt später): Übersichtspräparate wurden am besten fixiert in ZENKER und gefärbt mit HEIDENHAIN's Haematoxylin, oder mit Orange oder Erythrosin.

Mitochondrien wurden dargestellt nach REGAUD (Kalium-bichromat) oder nach CHAMPY mit Nachchromieren in Acetum pyroliginosum plus Chromsäure, dann Kalium-bichromat. Die Schnitte wurden gefärbt mit HEIDENHAIN oder mit ALTMANN-fuchsin.

Die GOLGISubstanz wurde dargestellt nach KOPSCH-KOLATSCHEW.

Fett und Glykogen wurden gemeinschaftlich dargestellt durch Osmierung, Bleichung und Färbung nach BEST (genauere Darstellung folgt).

1. Kapitel. Die Arbeitsräume in den Darmzellen eines frisch entnommenen Tieres

Die Arbeiten in der Darmzelle von *Ascaris* sind in Stockwerke verteilt wie in einer Fabrik. Bevor wir die Experimente wiedergeben, welche einen gewissen Einblick in die Arbeit in diesen Stockwerken gegeben haben, scheint es uns ratsam, erst den Aufbau der Stockwerke und ihren Hauptinhalt bei einem frisch entnommenen Tiere zu beschreiben. Dies ist zunächst eine rein statische Beschreibung.

Man kann die sehr langgestreckten, hoch differenzierten Zellen in je 5 Stockwerke einteilen; von der Basalmembran bis zum Apex (Abb. 1-5).

Stockwerk I: Die Basis der Zelle wird von einer auffallend dicken Basalmembran gebildet. Eine „Cuticula“ kann jedoch dieses Gebilde nicht genannt werden, weil eine Cuticula ein Ausscheidungsprodukt einer Epithelzelle nach der Außenseite ist; hier aber entsteht sie nach innen und es ist nicht bekannt, ob sie durch ein Sekret der Zelle geformt wird. Sie ist vielmehr aufzufassen als eine Basalmembran, wie sie jedem Epithel zukommt und die nicht zellig konstruiert ist. Sie zeigt eine auffallend gleichmäßige, bindegewebsartige zirkuläre Streifung. Diese Fasern werden nach HEIDENHAIN nicht gefärbt. Die Membran ist frei von Glykogen und Fett. Ihre Funktion liegt wohl hierin: sie bildet einen festen Schlauch (wie aus Gummi) auf dem die Zelle befestigt ist. Sie sitzt den Wasserkissen der „Füllzellen“ des Bindegewebes fest auf.

Stockwerk II. Dies ist der unterste Arbeitsraum der Zelle. Er ist von dem darüberliegenden Stockwerk durch die Membran a getrennt. Er ist frei von Glykogen und Fett; dagegen zeigt er ein sogenanntes „Fußplasma“: das Protoplasma ist in der Längsrichtung der Zelle gestreift. Nach Färbung mit HEIDENHAIN erweist es sich als ein „Ergastoplasma“; auch einige etwas dunklere Granula, die den Protoplasmafäden anheften, kommen zum Vorschein; ihre Bedeutung ist unklar.

Stockwerk III: Dies ist der wichtigste Arbeitsraum der Zelle, zugleich der längste und größte. Es können einzelne Unterstockwerke unterschieden werden, die je nach der Arbeit der Zelle eine verschiedene Größe haben:

A: basal schließt die Membran a dies Arbeitsfeld gegen Stockwerk II ab. Diese Grenze wird durch eine basalwärts gerichtetes und ausgebogenes Häutchen gebildet. Es ist unregelmäßig in seiner

Form und vielfach zerrissen: wahrscheinlich durch Stoffe, welche hier hindurchtreten. Durch HEIDENHAIN's Eisenhaematoxylin ist diese Abschlußmembran besonders deutlich darstellbar.

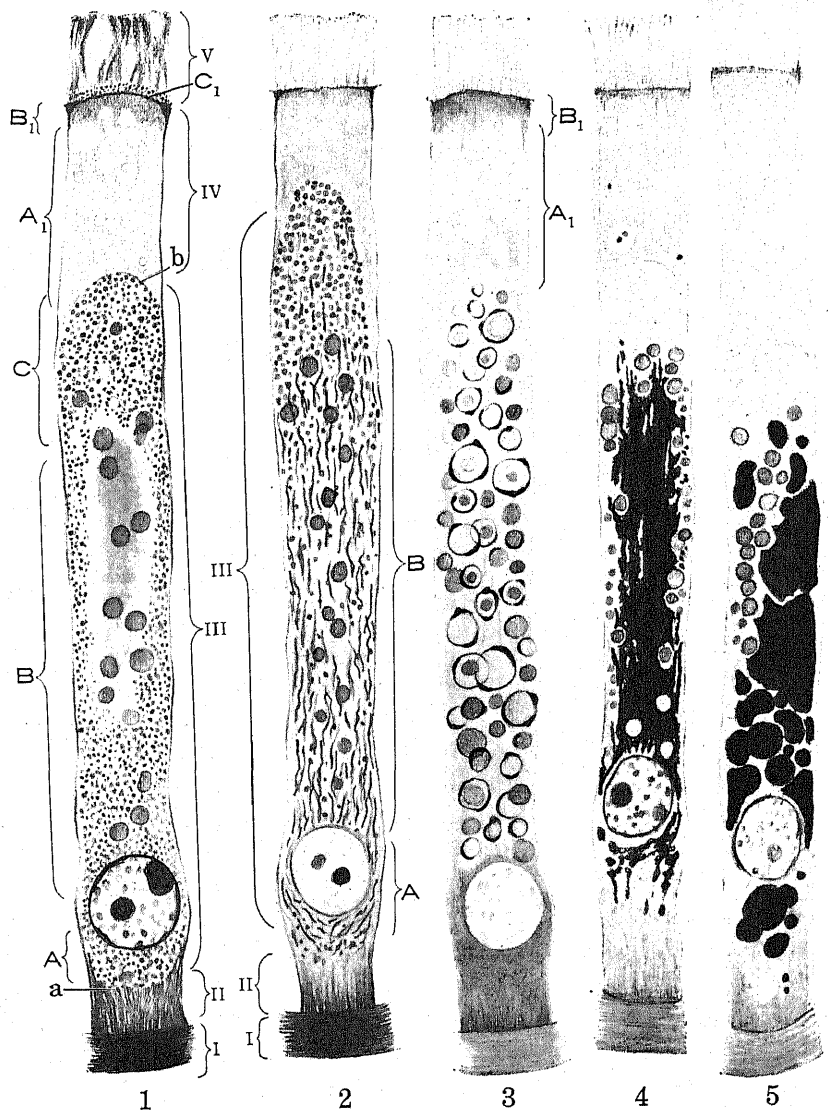


Abb. 1-5. 1. Übersichtspräparat der Darmzelle zur Demonstration der Einteilung in Stockwerke (Fix. ZENKER, Kombin. aus Haem. Eosin-präp. und HEIDENH. Eis.-Haematox). Die Ziffern und Buchstaben sind im Texte gebraucht als Bezeichnung der Arbeitsgebiete der Zelle. 2. Darstellung der Mitochondrien und der Granula A (klein) und Granula B (groß); fix. REGAUD, kombiniert HEID. Häm. und ALTMANN-Fuchsin. 3. Darstellung der Golgisubstanz auf der Phasengrenze zwischen Granula B und Protoplasma (KOPSCH-KOLATSCHEW). 4. Darstellung des Glykogens (schwarz) nach BEST. 5. Darstellung des Fettes (schwarz); Osmierung. In Abb. 1-5 sind Darmzellen dargestellt an frisch-entnommenen Tieren, mit denen also nicht weiter experimentiert worden ist. (Erklärung der Bezeichnungen im Text.)

B: das ist nun das Hauptarbeitsfeld der Zelle; alle anderen Zonen sind nur gewissermaßen Nebenräume. Es nimmt 40–50% des Zellraumes ein. Hier finden sich die wichtigsten, für die Stoffwechselerarbeit charakteristischen Strukturen:

1. Der Kern. Er liegt verschoben nach der Basis zu. Seine Lage ist sehr regelmäßig. Er ist rund, groß und bläschenförmig. Das Chromatin ist regelmäßig verteilt. Es finden sich 1–2 ansehnliche Nucleolen. Glykogen und Fett konnte in den Kernen nicht gefunden werden.

2. Die Mitochondrien (Abb. 2). Sie beginnen basal um den Kern herum in Form von langen Drähten und Stäbchen, welche kleine Anschwellungen an ihrer Oberfläche erkennen lassen. Nach dem Apex zu werden die Stäbchen meist kürzer.

3. Die Granula. Es gibt zwei verschiedene Arten Granula in diesem Zellraume; und diese Arten verhalten sich je nach Fixierung und Färbung der Zelle wieder recht verschieden. Sublimathaltige Fixierer wie ZENKER verändern die Granulastruktur bis zur Unkenntlichkeit. Die beste Übersicht über die Arten Granula gibt die Fixierung nach REGAUD und die Färbung nach M. HEIDENHAIN; dazu müssen vor allem Osmiumpräparate treten wie sie zur Darstellung des Fettes und der Golgisubstanz verwendet wurden. Dann ergibt sich schließlich: je mehr apikalwärts die Mitochondrien an Größe verlieren um so zahlreicher werden die Granula A (Abb. 2): kleine, nach REGAUD-HEIDENHAIN dunkelblaue Körnchen, welche dieselbe Farbe haben wie die Mitochondrien: sie befinden sich an der Oberfläche der Stäbchen (Abb. 2); je kürzer apikalwärts die Mitochondrien werden, umso häufiger und größer werden die Granula A., sodaß sich also die meisten in dem apikalen Teile des Raumes B finden.—Zweitens finden sich größere Granula B in dieser Zone: sie sind nach gewöhnlichen Fixierern oft gelblich gefärbt, nach REGAUD-HEIDENHAIN grau. Sie haben verschiedene Größe. Sie werden vor allem durch die Golgisubstanz gekennzeichnet.

4. Die GOLGISubstanz (Abb. 3) findet sich nur in diesem Unterstockwerk B. Sie liegt um die sich auflösenden gelben Granula B herum. Nach Anwendung der Methode von KOPSCH färben sich die Granula B in einem kleineren Zustande gleichmäßig dunkelgrau, also ohne daß eine Mantelsubstanz zu erkennen wäre. Bei dem allmählichen Wachstum des Granulums und seine schließliche Umwandlung in eine Vakuole entsteht auf der Phasengrenze zwischen dem Granulum und dem umgebenden Protoplasma die GOLGISubstanz: sie bedeckt schließlich wie eine schmale halbmondförmige Kappe die Oberfläche des sich auflösenden Granulums. Sie ist also meistens nicht gleichmäßig an der ganzen Oberfläche des Granulums verteilt,

sondern an bestimmten Stellen dichter oder dünner. Ein sich auflösendes Granulum, an seiner Außenseite teilweise bedeckt mit der GOLGISubstanz, läßt vielfach im Inneren doch eine sich auflösende Kugel erkennen. All diese Erscheinungen stehen mit der Sekretion im Zusammenhange, die wir weiter unten besprechen.

5. Außerdem dient dieses Unterstockwerk B auch noch der Aufstapelung von Stoffen, welche in der Zelle durch die intraplasmatistische Verarbeitung der aufgenommenen Nahrungsstoffe entstehen. Wir haben im besonderen Glykogen und Fett geprüft. Beide sind fast ausschließlich beschränkt auf das Unterstockwerk B. Das Glykogen (Abb. 4) ist niedergeschlagen in Form von dicken, unregelmäßigen Granula und Schollen, welche sich dicht zusammenlegen in langen Ketten, sodaß sie das Aussehen einer rissigen Kiefernborke erhalten. Der Hauptstapelplatz des Glykogens liegt oberhalb des Kernes; aber auch unterhalb hiervon findet sich noch Glykogen in dicken Brocken. Es liegt, vorallem um den Kern herum, zwischen grossen Vakuolen, welche Fett enthalten.

6. Auch das Fett (Abb. 5) ist nur auf das Unterstockwerk B beschränkt. Es ist viel unregelmäßiger deponiert als das Glykogen: in dicken unförmigen Klumpen und Brocken von meist länglicher Form. Nach dem Apex zu (aber immer innerhalb des Unterstockwerkes B) sind die Fettvakuolen kleiner als nach der Basis zu. Die verschiedenen Zellen des Darmes weisen große Unterschiede auf hinsichtlich der Masse des Fettes.

C: Das Unterstockwerk C unterscheidet sich vom Unterstockwerk B dadurch, daß C keinen Kern, keine Granula B, kein Glykogen und kein Fett enthält. Die in ihm seltener vorhandenen Mitochondrien sind kleiner als in B. Vorallem ist zu sagen, daß hier eine Auflösung der Granula zu beobachten ist: die in Zone B gebildeten Granula B werden hier verflüssigt und bilden Vakuolen. Vereinzelt können in dieser Zone auch noch Granula auftreten, die allmählich aufgelöst werden. Die Größe dieses Unterstockwerkes hängt ab vom Arbeitszustand der Zelle: je mehr in B aufgestapelt wird, umso kleiner wird C.

D: die obere Kappenmembran. Eine besonders durch ZENKER-HEIDENHAIN sehr deutlich darstellbare Membran, welche die Zone III von der Zone IV scheidet. Es ist hie und da zu sehen, daß die Membran sich stellenweise öffnen kann, um Vakuolen den Durchtritt nach oben zu gestatten. Nach dieser Tätigkeit aber schließt sie sich wieder und ist in jedem Arbeitsstadium deutlich zu erkennen. Sie ist dicker als die Grundmembran a.

Stockwerk IV ist eine Durchgangszone für Resorpta und Sekrete. Sie zerfällt in drei Unterstockwerke, welche stets zu

erkennen sind, deren Umfang aber wechselt, je nachdem welche Stoffe dieses Stockwerk IV passieren:

A¹: Dies ist der größte Teil des Stockwerkes IV. Er nimmt etwa 1/7–1/10 der Länge der Zelle ein, je nach dem Grade der Größe des Stockwerkes III. Einfache Plasmafärbungen lassen erkennen, daß hier feine Niederschlagsstränge von Eiweißen auftreten, die alle in der Längsrichtung der Zelle geordnet sind. Zwischen ihnen finden sich in bestimmten Stadien der Arbeit kleinere und auch größere Vakuolen, gefüllt mit einer Flüssigkeit; die Wand der Vakuolen bleibt ungefärbt und gelblich. Mitochondrien kommen nicht vor. Nach einer Osmierung (KOPSCH) zeigt sich nur eine gleichmäßig gelbe, leere Zone: also keine GOLGISubstanz. Glykogen findet sich nur in kleinen, ganz vereinzelt liegende runden Granula. Fett wurde nicht beobachtet.

B¹: Es folgt eine Protoplasmaschicht, deren Dispersitätsgrad der Eiweiß offenbar dichter ist als der untere Teil A¹ dieses Stockwerkes. Dieser Teil B¹ kann in einzelnen Fällen durchsetzt sein von kleinen Vakuolen, von denen man den Eindruck bekommt, daß sie sich nur langsam durch diese dichtere Zone hindurchdrängen.

C¹: die äußere Grenzmembran. Nach Fixierung in ZENKER und Färbung mit HEIDENHAIN's Eisenhaematoxylin tritt sie scharf hervor. Sie biegt kuppelförmig an den Seitenwänden der Zellen um und bildet hier einen stärkeren Ring, welcher mit denselben Elementen der Nachbarzellen teilweise verschmilzt. Durch diese „Kittleiste“ sind alle Darmzellen untereinander an ihren äußeren Enden verbunden; sie sind also gewissermaßen aufgehängt zwischen der festen Basalmembran (I) und jenem konsistenten Netzwerk mit großen sechseckigen Maschen, welche durch die äußere Grenzmembran C¹ gebildet wird.

Stockwerk V: Es wird gebildet durch den sogenannten Stäbchensaum: jene feinen, fingerförmigen Protoplasma-ausstülpungen, welche von einer Basis etwas granulierten Protoplasmas: dem Basalplasma aus nach dem Darmlumen zu sich ausbreiten. Nach Fixierung mit ZENKER und Färbung mit HEIDENHAIN's Eisenhaematoxylin sind die einzelnen Protoplasmafinger besonders deutlich zu unterscheiden. An mehreren Stellen des Darmes ist zu bestimmten Arbeitszeiten der Zelle zu erkennen, daß zwischen diesen Protoplasmaausstülpungen sich Sekretropfen und blasen hindurchdrängen, die von der Zelle aus in das Lumen sich ergießen.

Auch ganz wenig Glykogen in feinsten Körnern ist bei einem frisch entnommenen Tiere in der Regel in Basalplasma zu finden. Nach der Osmierung (KOPSCH) sind zwischen den Protoplasma-

fingernd äußerst kleine, dunkelbraune Granulationen zu finden, die aber nicht als GOLGISubstanz angesprochen werden können; im Basalplasma sind dagegen die obengenannten Granulationen nicht mehr erkennbar. Fett findet sich in dieser Zone nicht.

So sehen wir, daß die Darmzelle von *Ascaris* merkwürdigerweise in deutliche Stockwerke verteilt ist, von denen allein den mittelsten (III) die Rolle der eigentlichen Fabrikation der Sekrete und Stapelprodukte zukommt. Die oberhalb oder unterhalb hiervon gelegenen Stockwerke dienen nur dem Transport oder der Verarbeitung oder der Festigkeit des Ganzen.

2. Kapitel. Der Hungerstoffwechsel in der Darmzelle

Weitaus die meisten Tiere können 6 Tage ohne Nahrungszufuhr am Leben erhalten werden und zwar in Tyrode-Lösung ohne Hinzufügung von Zucker, also in einer reinen Salzlösung, bei 37°C.

Die Untersuchung des Darmes während des Hungerns hatte drei Ziele: 1. die Frage nach dem Schicksal des beim normalen Tiere so reichlich vorhandenen Glykogens und Fettes. Zweitens sollte durch den Hungerstoffwechsel geschieden werden zwischen Stoffen, welche während des Hungerns verbraucht werden, also dem Betriebswechsel angehören und den Sekretstoffen, welche während des Hungerns sich aufstapeln; auf diese Weise konnte dem Aufbau der Sekretgranula nachgegangen werden, während die Zellen je länger je mehr leer werden an Reservestoffen. Die Zelle ist normal zu dick vollgepackt mit Stoffen, als daß man leicht die verschiedenen Teile unterscheiden könnte, besonders in dem Unterstockwerk B.

Drittens mußte die Zelle entleert werden von Baustoffen, um die nötige Basis für die Beobachtung des Wiederaufbaues der Stoffe zu haben, über welche wir später berichten werden. Es handelt sich also um zwei entgegengesetzt verlaufende Beobachtungsreihen während der Hungerzeit: die Beobachtung der Sekrete in ihrem Aufbau und die Beobachtung der Betriebsstoffe in ihrem Abbau.

Der Abbau des Fettes

Wir haben sechs Stufen unterschieden: das normale, frisch entnommene Tier und Tiere, welche 1, 2, 3, 5 und 6 Tage gehungert hatten. Der Fettabbau vollzieht sich so deutlich innerhalb der 6 Tage, daß es sich erübrigt, exakte Messungen durch Wägen zu machen. Schon bei der einfachen Beobachtung ergibt sich, daß der Fettabbau sich äußert auf zwei verschiedene Art und Weisen: 1. schwankt die Anzahl derjenigen Zellen, welche Fett besitzen in einer eigentümlichen Weise; und 2. verschwindet aus diesen Zellen das Fett in der allgemein charakteristischen Form.

1. Betrachten wir zunächst einmal die Anzahl der Zellen, welche überhaupt Fett besitzen. Wir haben hier Zählungen durchgeführt und sind zu dem folgenden Ergebnis gekommen:

Das normale, frisch-entnommene Tier hat etwa 73% Darmzellen, welche Fett besitzen. (Es ist also unrichtig, wenn v. KEMNITZ 1912 schreibt, daß *Ascaris* nur in sehr wenigen Darmzellen Fett enthalte).

Nach einem Tage Hungern ist die Anzahl der fettbesitzenden Zellen auf 20% herabgesunken; und nach zwei Tagen zeigen ebenfalls 20–21% der Zellen noch Fett.

Vom 3. Tage an geschieht dagegen etwas Merkwürdiges: die Anzahl der fetthaltigen Zellen hat wesentlich zugenommen: sie ist auf etwa 90–94% gestiegen. Zwar ist das Fett hier in einer anderen Weise deponiert als bei dem normalen Tiere, aber die Anzahl der fetthaltigen Zellen ist gestiegen.

Nach 5 Tagen ist die Anzahl der fetthaltigen Zellen auf 57% gesunken und nach 6 Tagen Hungern auf 38%.

Es ergibt sich also, daß in den ersten zwei Tagen die Anzahl der fetthaltigen Zellen sinkt, am 3. Tage jedoch das Fett fast über alle Zellen verteilt ist und daß dann langsam die Anzahl der fetthaltigen Zellen bis zum 6. Tage wiederum abfällt.

2. Es ist aber notwendig, hierbei die Abbauvorgänge im Auge zu behalten, welche sich in denjenigen Zellen abspielen, welche überhaupt Fett besitzen. Sieht man im Präparat nur nach diesen Zellen, dann ergibt sich die folgende Reihe:

Das normale, frisch-entnommene Tier (Abb. 5) besitzt in seinen fetthaltigen Zellen das Fett in ziemlich dicken, groben Klumpen und Ballen; das Fett erstreckt sich fast durch die ganze Zone B und ist besonders um den Kern herum sehr dick gehäuft.

Nach 1–2 Tagen Hungern lassen die fetthaltigen Zellen vielleicht eine kleine Verminderung ihres Fettgehaltes erkennen; aber sonst unterscheidet sich das Bild nicht von dem normalen Tiere. Hierbei müssen wir im Auge behalten, daß die Anzahl der fetthaltigen Zellen sich stark verminderte in diesen 2 Tagen.

Nach 3 Tagen Hungern (Abb. 7) jedoch sind die großen Fettballen größtenteils verschwunden; nur hie und da findet sich noch ein solcher unterhalb des Kernes. Es sind von jetzt ab kleinere Fettvakuolen in den Zellen aufgetreten, die sich hauptsächlich apikal des Kernes befinden und schon nicht mehr die gesamte Zone B einnehmen; der obere Teil der Zone B enthält kein Fett, sondern nur Glykogen und Granula.

Nach 5–6 Tagen Hungern sind die großen Fettballen ganz verschwunden: die kleinen Fettvakuolen finden sich vor allem dicht ober-

halb des Kernes, etwas auch unterhalb. Nach 6 Tagen Hungern (Abb. 8) jedoch finden sich nur noch kleine Fettvakuolen, die

größtenteils an Masse stark abgenommen haben; und diese liegen fast ausschließlich unterhalb des Kernes.

Schlußfolgerung: Es ergibt sich also aus der Vergleichung der fetthaltigen Zellen, daß während des Hungerns der Fettgehalt stark vermindert wird: die großen Fettballen verschwinden innerhalb von 2 Tagen; nach 3 Tagen Hungern besitzen zwar fast alle Darmzellen Fett, aber fast nur in kleinen Fettvakuolen, während die großen Fettballen fast ganz verschwunden sind. Das Merkwürdige ist nun, daß (wie wir oben sahen) nach 3 Tagen Hungern weitaus die meisten Zellen des Darmes diese Form von Fett in kleinen Granula erkennen lassen; also auch Zellen, welche vorher kein Fett besaßen, sondern nur Glykogen, besitzen nach 3 Tagen Hungern jene kleinen Fettvakuolen; und diejenigen Zellen, welche vorher schon die dicken Fettmassen besaßen, haben diese abgebrochen zu kleinen Fettgranula. Wir können hieraus schließen, daß während der ersten 3 Tagen ein starker Fettstoffwechsel stattfindet: Abbau der großen Fettballen in den fetthaltigen Zellen; gleichmäßige Verteilung des Fettes über fast alle Zellen

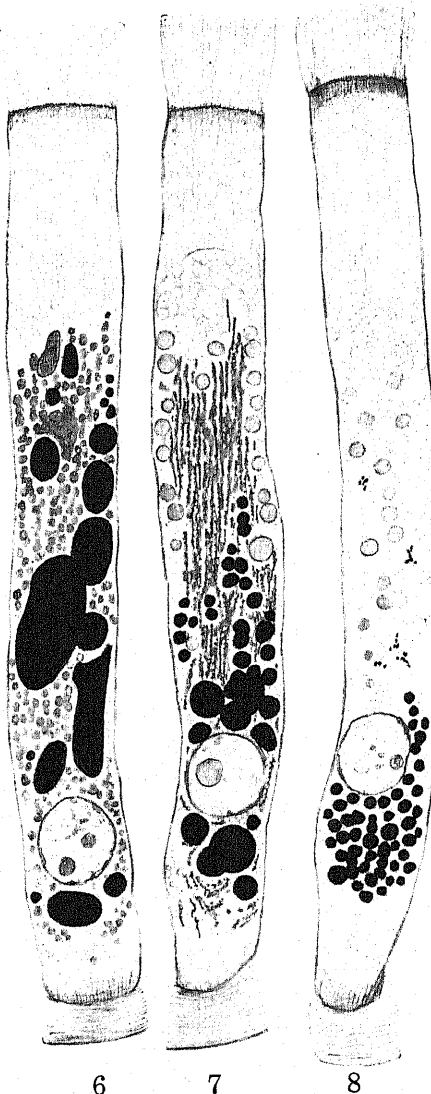


Abb. 6-8. Darstellung der Erscheinungen während des Hungerns. Fett und Glykogen sind gleichzeitig in der Zelle dargestellt: das Fett tief schwarz, das Glykogen grau. 6: 1 Tag Hungern. 7: 3 Tage Hungern. 8: 6 Tage Hungern.

und Entstehen der kleinen Fettvakuolen. Wie ist nun das Fett auch in den ursprünglich nichtfetthaltigen Zellen entstanden? Entweder aus dem vorhandenen Glykogen oder durch eine gleichmäßige Ver-

teilung des vorher nur in besonderen Zellen deponierten Fettes über alle Darmzellen; ich vermute das Erstere.

Das Ende ist, daß nach 6 Tagen sich noch in 38% der Darmzellen etwas Fett befindet: jedoch nur noch in wenigen kleinen Fettvakuolen unterhalb des Kernes. Damit ist das Fett bis auf wenige Reste aus den Zellen verschwunden und im Körper verbraucht worden.

Für den Aufbau der Zelle in Stockwerken ist es wichtig zu beobachten, daß das Fett zuerst am apikalen Teile der Zone B abgebrochen wird und daß der Abbau sich langsam nach unten zu vollzieht. Der Abbau bewegt sich also vom apikalen zum basalen Teile der Zone B: d.h. basalwärts.

Der Abbau des Glykogens

Der Abbau des Glykogens läßt sich stufenweise verfolgen von dem normalen Tiere bis zum 6. Tage des Hungerns.

Normales Tier (Abb. 4): das Glykogen nimmt die ganze Zone B ein; es liegt besonders an der apikalen Seite dieser Zone in dicken Brocken. Dicht oberhalb des Kernes wird das Gefüge des Glykogens bereits lockerer: kleinere Schollen und kürzere Stränge; unterhalb des Kernes ist häufig kein Glykogen zu erkennen, in anderen Fällen nur wenig.

1 Tag Hungern (Abb. 6): das Glykogen ist schon stark abgebaut (es ist aber nicht richtig, wenn v. KEMNITZ 1912 behauptet, daß es bereits „nicht mehr nachgewiesen werden konnte“). Wir fanden: die großen Borkenstücke des Glykogens sind sehr selten geworden; am apikalen Ende der Zone B liegen hie und da noch einige dickere Ballen; sie sind aber selten. Dagegen treten jetzt zum ersten Male die kleineren Glykogen-Granula deutlich isoliert hervor; sie entstehen durch Auseinanderfallen der Borkenstücke. Sie erfüllen die ganze Zone B, vorallem um den Kern herum. Sie sind aber unterhalb des Kernes in geringerer Menge vorhanden als oberhalb.

Hieraus ergibt sich schon eine interessante Tatsache: das Glykogen wird in der umgekehrten Richtung wie das Fett abgebaut; nämlich von unten nach oben.

2 Tage Hungern: die großen Borkenstücke des Glykogens sind jetzt gänzlich verschwunden. Die kleineren Glykogengranula liegen teils isoliert, teils sind sie zu Schnüren angeordnet. Sie finden sich vorallem im apikalen Teile der Zone B; im unteren Teile dieser Zone finden sich weniger Granula (Vergl. Abb. 7).

3 Tage Hungern: die Granula finden sich nur noch im apikalen Teile des Raumes B; der basale Teil ist leer. Auffallend war uns, daß im apikalen Teile sich das Glykogen jetzt vielfach in größeren Vakuolen befindet, welche diffus mit einem feinverteilten roten Stoff erfüllt sind. Um den Kern herum liegt fast kein Glykogen mehr.

5 bis 6 Tage Hungern: fast alles Glykogen ist verschwunden; nur noch wenige Reste in Form kleiner Granula liegen im apikalen Teile des Raumes B und zwar im Plasma um Vakuolen herum (Abb. 8).

Schlußfolgerung: Hieraus ergibt sich, daß der Abbau des Glykogens erfolgt in der Richtung von unten nach oben: also apikalwärts.—Zweitens daß die im normalen Tiere vorhandene Glykogenmasse auf die folgende Weise aufgelöst wird: 1) Es werden die großen Borkenstücke und Stränge des Glykogens zertrümmert, sodaß sich das Glykogen nach 1 Tage Hungern nur in Form einzelner oder aneinander gereihter Granula vorfindet: Abbau zugleich mit Oberflächevergrößerung des Materials.—2) Und schließlich wird das Glykogen in relativ großen Vakuolen im Protoplasma aufgelöst, welche nur noch teilweise mit Glykogen, wahrscheinlich größtenteils mit Zucker erfüllt sind. Eine Abtransport von Glykogen als solchem findet während des Hungerns nicht statt; wenn überhaupt eine Stoffbewegung während des Hungerns vom Darm zu den Organen stattfindet, so geschieht dies in Form von Zucker.

3. Kapitel. Der Aufbau des Sekretes während des Hungerns

Während Fett und Glykogen abgebrochen werden, werden zu gleicher Zeit die Sekretstoffe aufgebaut und aufgestapelt. Dies geschieht in der folgenden Weise (vergl. das oben über Granula Gesagte!):

1 Tag Hungern: mit Osmiumsäure fixierte Präparate zeigen, daß die Granula B nur in dem Raume B vorkommen und hier wiederum nur apikal des Kernes. Das Stockwerk IV ist erfüllt nur von einem feinen ausgeflockten Eiweiß; Granula und Vakuolen sind hier nicht zu erkennen.

3 Tage Hungern: die Granula B sind bis in den Raum C vorge drungen, weil sie sich in Anzahl vermehrt haben. Sie liegen also jetzt etwas oberhalb des noch vorhandenen Glykogens. Die Granula B selbst sind sehr groß geworden, so umfangreich, wie ich sie sonst auf keiner Stufe gesehen habe.—Die interessanteste Erscheinung aber tritt jetzt in dem Raume C auf: er ist angefüllt von feinen, kleinen Vakuolen, deren Lichtbrechung geringer ist als die der Granula B.—Das Stockwerk IV und V sind ohne sonst erkennbare Struktur. Vakuolen finden sich hier nicht.

6 Tage Hungern: die Anzahl der Granula B hat abgenommen. In dem Raume C finden sich jetzt keine kleinen Vakuolen mehr, sondern große Hohlräume, die im Leben gefüllt sind mit Flüssigkeit.

Aus den Beobachtungen am Normaltier und aus den Hungererscheinungen kann man vorläufig schließen, daß der Weg des Aufbaus des Sekretes bei *Ascaris* vielleicht so ist:

Die ersten Granula A werden gebildet mit Hilfe der Mitochondrien (Abb. 9), welche an ihrer Oberfläche diese Granula

entstehen lassen und wohl auch selbst Stoffe zu deren Aufbau beitragen, denn die Mitochondrien werden vom basalen zum apikalen Teile der Zelle immer kleiner, jemehr die Granula A an Größe zunehmen. Die Granula A machen sich los vom ursprünglichen Mutterboden und kommen in das Protoplasma. Hier wachsen sie heran. Nach einiger Zeit ist an der Phasengrenze zwischen Plasma und Granulum die GOLGISubstanz zu erkennen. Diese so heranwachsenden Granula B haben ein viel stärkeres Lichtbrechungsvermögen als die Granula A und sind vorallem durch die GOLGISubstanz ausgezeichnet. Es wird also vorläufig angenommen, daß die Granula

A in B übergehen durch Bildung und Wachstum der GOLGISubstanz; doch ist diese Hypothese für *Ascaris* zunächst nur

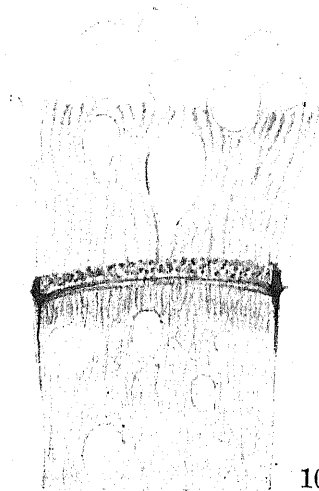
eine Annahme; es ist auch möglich, daß beide Granulaarten getrennt entstehen. Weitere Untersuchungen werden das lehren.

Während des Wachstums der Granula B zu immer größeren Granula verschwindet die GOLGISubstanz allmählich. Die auf diese Weise gebildeten granulären Stoffe dringen in den vorderen Teil des Raumes III ein und stapeln sich hier während des 3 Hungertages in Form von Vakuolen auf. Der Raum C wird auf diese Weise während des Hungerns immer größer auf Kosten des Stockwerkes IV. Mit der zunehmenden Aufstapelung werden die Vakuolen im Raume C immer größer. In diesem Zustande wartet die Zelle auf den Fütterungsreiz, wobei das Sekret in kleinen Tropfen erst die abgrenzende Membran D durchsetzt. Dann werden im Raume A¹ die ersten Vakuolen sichtbar (Abb. 1 und 10), welche durch das dichtere Plasma des Raumes B¹ vorläufig noch zurückgehalten werden.

Schließlich wird auch die Grenzmembran C¹ von der Sekretflüssigkeit durchsetzt und das basale Plasma des V. Stockwerkes ebenfalls durchspült (Abb. 10). Es bilden sich wiederum Tropfen,



9



10

Abb. 9-10. 9. Im Verhältnis zu den anderen Abb. stark vergrößerte Darstellung von 2 Mitochondrien, welche an ihrer Oberfläche die Granula A entstehen lassen, wobei offenbar auch Teile der Substanz der Mitochondrien teilnehmen; Technik wie Abb. 2. 10. Austritt von Sekretvakuolen durch die oberen Stockwerke der Zelle; Technik wie Abb. 1.

welche zwischen den fingerförmigen Ausstülpungen des Stockwerkes 5 in das Lumen des Darmes eintreten (Abb. 10).

Weitere Untersuchungen über die anderen Tätigkeiten des *Ascaris*darmes sind schon größtenteils beendet und werden in Kürze veröffentlicht werden.

Zusammenfassung

In jeder Zelle des *Ascaris*darmes findet Sekretion, Resorption, intraplasmatische Verarbeitung und Aufstapelung der Reservestoffe statt. Hier ist nur folgenden ersten Fragen der Darmtätigkeit nachgegangen:

1. Es werden in der Darmzelle von *Ascaris* fünf strukturelle Stockwerke beschrieben (Abb. 1–4), von denen I die auffallend starke Basalmembran bildet, II eine Ergastoplasmazone. Das Stockwerk III ist der wichtigste Arbeitsraum der Zelle. Er wird nach oben und unten durch eine besondere Membran abgeschlossen. Er kann in mehrere Unterstockwerke verteilt werden, von denen B wiederum das Hauptarbeitsfeld bildet: hier liegen der Kern und die Mitochondrien, hier entstehen die Granula in zwei verschiedenen Formen und hier wird die Golgisubstanz an der Phasengrenze zwischen Granula B und Protoplasma gebildet; außerdem wird hier vor allem Glykogen und Fett niedergeschlagen. Das Stockwerk IV ist eine Durchgangszone für Resorpta und Sekrete. Abgeschlossen nach außen wird die Zelle durch eine äußere Grenzmembran und durch das Stockwerk V, welches aus einem Basalplasma und zahlreichen fingerförmigen Protoplasmaausstülpungen besteht.

2. Während des Hungerns (Abb. 6–8) werden Fett und Glykogen abgebaut. Die Anzahl der fetthaltigen Zellen während 6 Tagen Hungerns schwankt: sie nimmt anfänglich ab, ist am 3. Tage wieder angestiegen, um bis zum 6. Tage wieder abzusinken. Weiterhin ist zu sehen, daß die großen Fettbrocken in kleinere Fettvakuolen aufgeteilt werden, und zwar geschieht der Abbau langsam vom apikalen zum basalen Teile der Zone B: d.h. basalwärts.

Das Glykogen dagegen wird in umgekehrter Richtung: von unten nach oben abgebaut, also apikalwärts. Ein Abtransport von Glykogen findet während des Hungerns nicht statt.

3. Während des Hungerns werden Sekretstoffe aufgebaut und aufgestapelt. Die kleinen Granula A entstehen an der Oberfläche der Mitochondrien unter teilweisem Aufbrauch der Mitochondriensubstanz (Abb. 9). Wahrscheinlich gehen diese Granula A in B über, doch ist dies für *Ascaris* noch nicht sicher. An der Oberfläche der Granula B entsteht die Golgisubstanz. Diese großen Granula werden in Vakuolen aufgelöst, welche durch die oberen Stockwerke und zwischen den fingerförmigen Ausstülpungen hindurch in das Lumen des Darmes eintreten (Abb. 10).

A Report on Meiosis in the Two Hybrids, *Brassica alba* Rabh. ♀ × *B. oleracea* L. ♂ and *Eruca sativa* Lam. ♀ × *B. oleracea* L. ♂

By

Nagaharu U, Tutumi Nagamatsu and Usaburo Midusima
Kōnosu Farm of the Imperial Agricultural Experiment Station

During the course of the study of the genome-analysis in *Brassica* performed by one of the authors, several interspecific or intergeneric crosses in Cruciferae have been undertaken at Konosu Farm of the Imperial Agricultural Experiment Station, the main part of which has been reported already by U (1934). In this paper the authors intend to report the karyo-genetical facts observed in two hybrids which have been obtained in the spring of 1934 and been left out in publication. One of them has been raised in the species cross, *Brassica alba* Rabh. ♀ × *B. oleracea* L. ♂ and the other in the intergeneric cross, *Eruca sativa* Lam. ♀ × *B. oleracea* L. ♂.

The F_1 hybrids obtained in both crosses are utterly sterile and for all our efforts made in these two successive years in raising F_1 by cutting propagation or by mother stock reserving of the individuals, they failed to give any seeds. Moreover, all the reserved F_1 individuals have gone away affected by the extraordinary hotness in this year. Thus we have lost our prospect of success in obtaining the later generations and the report is obliged to confine only in the F_1 hybrids.

A brief description of the parental species. The variety of *B. oleracea* here used as the pollen parent is acephara, the kale, the reduced number of chromosomes of which is confirmed to be 9. *B. alba*, the white mustard, is formerly classified as *Sinapis alba* which is characterized by having 12 chromosomes as its haploid number. In the vegetative feature it stands alone from the other

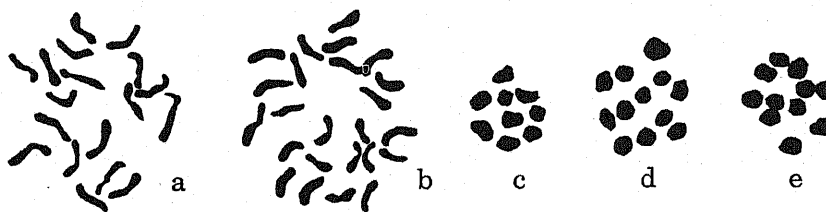


Fig. 1. Meiotic and somatic metaphase in the parental species. a and b, Polar views of somatic metaphase in the root-tip cell division. a, *B. oleracea*. b, *B. alba*. c-e, Polar views of heterotypic metaphase in the microsporogenesis. c, *B. oleracea*, d, *B. alba*. e, *Eruca sativa*. ×2400.

species in *Brassica* and is easily distinguished from the latter by the lyrate rosette leaves with complete incision, the hairy epidermis throughout the body, and the peculiar flat shape of pods. *Eruca* is a small genus containing a few species which originate in the mountains of Europe and central Asia. *E. sativa* is the garden rocket having 22 somatic and 11 meiotic chromosomes. Its pinnate rosette leaves with deep incision and its corolla consisted of four narrow, flesh-coloured, petals with veins distinct by the anthocyanin pigmentation present a quite different morphology from those of the species in *Brassica*.

Methods

Bouin's and Navashin's fixative were used, the former were employed for fixing flower buds and the latter for root-tips. In the early stages of work Newton's gentian violet and Feulgen's fuchsin-sulfurous acid were applied in staining, though they were proved rather unsuitable for the minuteness of the chromosomes, and all later staining was made with Heidenhain's haematoxylin.

Drawings were made with a Zeiss camera lucida, using a Zeiss 120 apochromatic objective and a 20 × compensating eyepiece.

F₁ *B. alba* Rabh. ♀ × *B. oleracea* L. ♂

Four F₁-plants have been raised from 49 flowers pollinated, all of

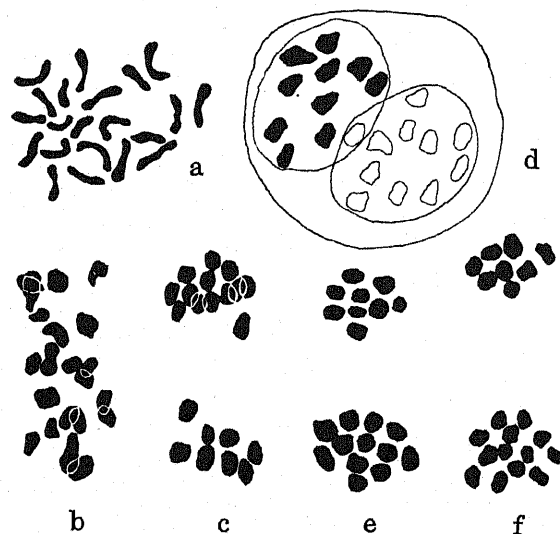


Fig. 2. Somatic and meiotic division in the F₁ *B. alba* ♀ × *B. oleracea* ♂. a, A somatic nuclear plate with 21 chromosomes. b, Heterotypic metaphase showing 21 univalents. c, Heterotypic anaphase presenting 8 and 13 chromosomes in each polar region. d, Interphase. e and f, Homotypic metaphases. ca. ×2400.

which were uniform in the morphology. Their vegetative feature resemble closely the female parent, *B. alba*, but their leaves are hairless, waxy, stiff, and dark green like those of the male parent, *B. oleracea*. The nuclear plates found in their root-tip cells present 21 somatic chromosomes which correspond to the sum of the gametic numbers of both parental species. The microsporogenesis in the F₁ hybrids pro-

ceeds quite abnormally. Not a single syndetic union of chromosomes is noted here. The spindle in the first metaphase develops with 21 scattered univalents and a typical semiheterotypic division is carried out. The numbers of chromosomes counted in both polar region in the following anaphase almost accorded with those of the theoretical frequency distribution calculated. Of course, a small number of the restitution nuclei are here met with and the lagging of chromosomes is frequently observed resulting in the exclusion of chromatin substance from the daughter nuclei. The 2nd division goes rather regularly. As a necessary consequence of such a division, most of the pollen cells found in the matured anthers are small and shrivelled, but very few of them are large and perfect. A greater part of the flower buds have become discoloured and dropped away before they opened, yet a few of them have bloomed and grew into deformed, empty pods.

F₁ *Eruca sativa* Lam. ♀ × *B. oleracea* L. ♂

Six F₁-plants were obtained in the numerous crosses. Morphologically they were quite alike showing the intermediate feature of both parents. Their rosette leaves are waxy and dark green like those of *B. oleracea*, but are deeply incised. They take after *Eruca sativa*, however, closely in their collora, the petals of which are narrow and flesh-coloured with bright, red veins.

The authors have failed to confirm their somatic number of chromosomes in their root-tip cells which did not offer any clear views of the division. At diakinesis in the microsporogenesis a variable number of chromosomes, ranging from 17 to 20, are found in the nuclear area, a few of which are apparently bivalent. By the observation of a number of side views of the spindles formed in the following metaphase the chromosome configurations in the hybrid plants are determined as

$$(0-3)_{II} + (20-17)_{I}.$$

The frequency appearance of the number of bivalents is given in the following table.

The bivalents situate usually in the equatorial region and are distinguished easily from the univalents, which are scattered at random position throughout the entire spindle, by their long, stretched form.

Table 1. The frequency appearance of the number of bivalents in the first metaphase

Number of bivalents	3	2	1	0
The frequency	45	31	15	9

The disjoining of the bivalents in the early anaphase is observed to be normal and as the division proceeds their daughter halves go to the

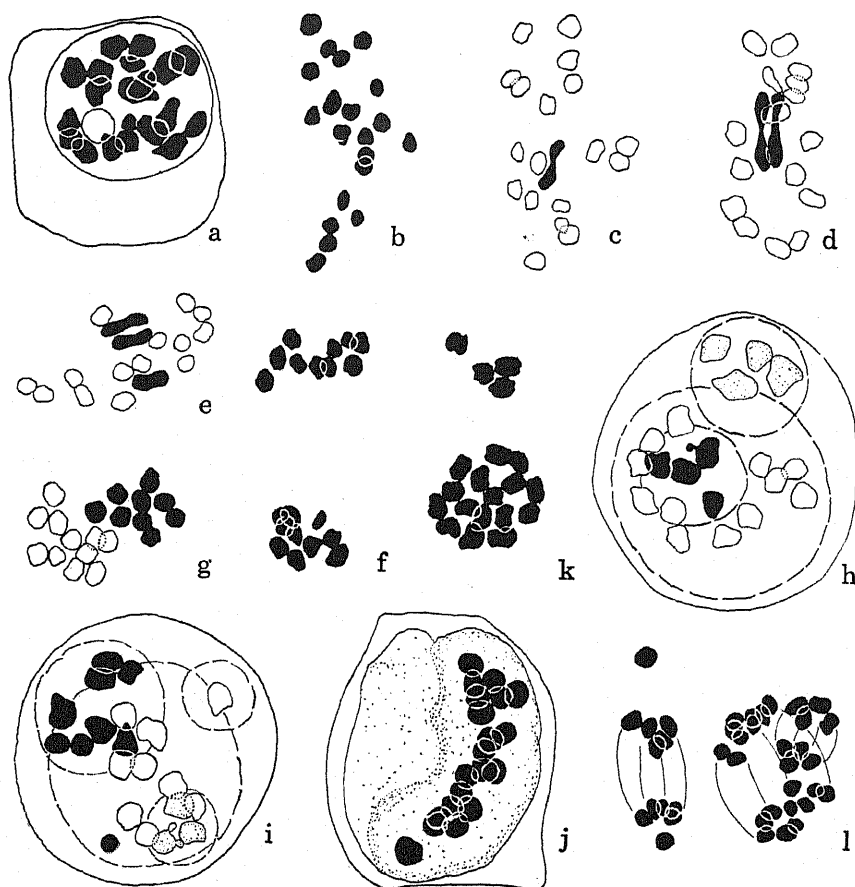


Fig. 3. Reduction division in the F_1 *Eruca sativa* ♀ × *B. oleracea* ♂. a, Diakinesis with 20 unpaired chromosomes. b-e, Heterotypic metaphases showing; b, $21I$. c, $1II+18I$. d, $2II+16I$. e, $3II+14I$. f and g, Heterotypic anaphases. h and i, Interphases showing extra daughter nuclei. j, a large interphase nucleus with whole number of chromosomes. k, Homotypic metaphase showing 2 daughter plates with 16 and 3 chromosomes and a stray one. l, Homotypic anaphase with 3 spindles. ca. $\times 2400$.

opposite poles. The behavior of the remaining univalents is remarkably abnormal, some of them proceed towards the nearer pole following after the daughter bivalents, but others hold their position forming extra interphase-like nuclei. Consequently in the metaphase of the homotypic division more than two spindles are commonly found in one mother cell which result in the formation of supernumerary microcytes.

When the hybrids have grown into flowering stage the deformation of the floral organs is manifested in a variable manner. An incomplete pistil with a curved style and a deformed stigma is commonly observed which drops away shortly after the fall of the petals.

Staminody is also common and the apparently normal stamens have frequently empty anthers.

Remarks

As described above the genome of *B. alba* is observed to have no particular relation to that of *B. oleracea* and in consideration of the result of the genome-analysis in *Brassica* it plays no rôle in the constitution of the compound genomes of the polyploid species in the genus which are due to the collaboration of two of the three basic genomes with 8, 9, and 10 chromosomes found in *B. nigra* Koch., *B. oleracea* L., and *B. campestris* L. respectively. Further it stands morphologically alone from the other species in the genus. From these facts, it can perhaps be considered appropriately that *B. alba* should be classified as an outsider of the genus *Brassica*, the definite affirmation of which, however, will rest upon further studies.

The bivalent formation, 3 the maximum number, observed in the *Eruca-Brassica* hybrid can be considered in three cases to be due 1) to the autosyndesis among the *Eruca*-chromosomes, 2) to the allosyndetic union of the members of the two different genomes contributed from each side of the parents, or 3) to the autosyndesis presented by the chromosomes of *B. oleracea*. Recently it has been suggested by several workers, such as Pease (1926), Lawrence (1929), and Catcheside (1934), from the genetical standpoint that *B. oleracea* is partially polyploid, and after Catcheside the haploid set of 9 chromosomes of which is of the type:

A A
B B
C C
D
E
F.

The authors can not attain to a very definite conclusion at present to which of the three cases it can be due. Though the fact affords us a very interesting problem for the elucidation of the origin of the simple genomes in *Brassica* together with the karyological data obtained in the study of various crosses made in these three years, to which the authors will refer in another paper.

Literature cited

- Catcheside, D. G.: The chromosomal relationships in the swede and turnip group of *Brassica*. *Ann. Bot.*, 48, 600-633, 1934.
Lawrence, W. J. C.: Incompatibility in polyploids. *Genetica*, 12, 269-296, 1930.
Pease, M.: Genetic studies in *Brassica oleracea*. *Genetics*, 16, 363-385, 1926.
U, N.: Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jap. Jour. Bot.*, 7, 389-452, 1935.

Über die Anthocyanophoren von *Erythraea*

Von

Friedl Weber

Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

(Mit 1 Tafel und 1 Textfigur)

LIPPMAN (1926) hat gefunden, daß in den Epidermiszellen der Blütenkrone von *Erythraea* das Anthocyan nicht im Zellsaft gelöst ist, sondern an bestimmt geformte Körper gebunden vorkommt. Diese Körper nennt LIPPMAN Anthocyanophore. Vor LIPPMAN hat POLITIS (1911, 1914) Anthocyan-gefärbte Inhaltskörper von Blütenzellen verschiedener Pflanzen beschrieben. Er hielt sie für Plastiden und bezeichnete sie demnach als „Cyanoplasten“. Einen neuen Fall eines Anthocyanophors gibt MOLISCH (1928) für die Fruchtoberhaut von *Gunnera chilensis* an. Auch in den Blütenzellen von Boraginaceen ist das Anthocyan an gallertartig feste Körper gebunden; darüber liegt eine Reihe von Arbeiten vor (u.a. GICKLHORN & WEBER 1926, KÜSTER 1935, WEBER 1934, 1935). Über Zellinhaltskörper, welche das Anthocyan des Zellsaftes an sich reißen, hat GUILLIERMOND wiederholt berichtet (1933, 1934). Nach SCHARINGER (1936) sind die Anthocyankörper in den Perianth-Zellen von *Delphinium* doppelbrechend.

Die vorliegende Notiz bezieht sich auf die Anthocyanophoren der Blüten von *Erythraea*. LIPPMAN hat die Arten *E. pulchella* und *E. litoralis* daraufhin untersucht. Die folgenden Angaben betreffen die Epidermiszellen der Blütenkrone von *Centaureum umbellatum* (*Centaureum minus*, *Erythraea Centaureum*). Die Pflanzen stammen aus der Umgebung von Graz.

Bei Flächenansicht der Epidermiszellen der *Erythraea* Kronblätter zeigen sich die licht bis dunkel-rosa gefärbten Anthocyanophoren entsprechend der Zellform als viereckige, häufiger länglich rechteckige bis schmal streifenförmige Platten, je eine in der Mitte der Zelle gelegen; die Dicke der Platten ist sehr gering. An den Rändern der Längsseiten sind die Anthocyanophoren bisweilen etwas aufgebogen.

Bei Herstellung von Schnitten werden die Anthocyanophoren nicht selten aus verletzten Zellen herausgezogen, sie bleiben dann in Wasser lange Zeit unverändert. Über den Schnitttrand herausragende Anthocyanophoren zeigen häufig Drehungen, so daß sie nicht mehr von der Fläche sondern an einem Ende oder gänzlich sich von der Schmalseite darbieten. An solchen Präparaten fiel es

zunächst auf, daß bei Beobachtung im polarisierten Lichte die Anthocyanophoren in bestimmter Stellung aufleuchten, also doppelbrechend sind. Die Durchsicht zahlreicher Präparate von Flächen-, Quer- und Längsschnitten bestätigte die nach dem morphologischen Aussehen unerwartete Beobachtung, daß die für amorph, gallertig-schleimartig gehaltenen Anthocyanophoren von *Erythraea* tatsächlich optisch anisotrop sind. Die Anthocyanophoren erscheinen im polarisiertem Lichte orangegelb oder bläulich, die rote Eigenfarbe wird also überdeckt, es kann daher der Grad der optischen Anisotropie kein geringer sein.

Von der Fläche gesehen, wie sich die Anthocyanophoren in der Zelle in der Regel darbieten, leuchten die rosa Plättchen im polarisiertem Lichte nicht auf, dagegen dann, wenn sie in Profilstellung und somit von der Kante zu sehen sind. Auch an Querschnitten durch das Kronenblatt kann man bei bestimmter Lage des durchschnittenen Anthocyanophors das Aufleuchten sehen. Das Aufleuchten in Profilstellung und das Erlöschen in Flächenstellung dürfte nicht durch die verschiedene Schichtdicke in diesen beiden Lagen bedingt sein, da auch kleine Fragmente der Anthocyanophoren deutlich aufleuchten, wenn sie sich in der richtigen Stellung befinden. Die Isotropie in der Flächenansicht der Anthocyanophore ist also keine scheinbare, vielmehr dürften die Anthocyanophoren-Plättchen in der Flächenansicht keine Spur von Doppelbrechung zeigen, die optische Achse also senkrecht auf die Fläche stehen.

In den intakten, lebenden Zellen findet man die Anthocyanophoren meist nur selten und vereinzelt in Profilstellung, manchmal kommt es aber vor, daß diese Stellung und nicht die sonst übliche Flächenstellung in einer großen Zahl von Zellen eingenommen wird. Es scheint also so, als ob die Anthocyanophoren innerhalb der intakten Zellen „vital“ Drehungen ausführen könnten. Diese Lageveränderung würde ganz der der Chloroplasten des *Mesocarpus*-Typus entsprechen. Während aber die Chloroplasten im Cytoplasma liegen und selbst lebende Gebilde sind, ihre Lageveränderungen daher als aktiv oder passiv bis zu einem gewissen Grade verständlich werden können, so liegen die Anthocyanophoren angeblich im Zellsaft und die Mechanik ihrer Drehung würde daher einer besonderen Untersuchung bedürfen. Auch die Bedingungen unter denen die Drehungen stattfinden, bleiben aufzuklären. Besonders zahlreich findet man Anthocyanophoren im Flächenbilde der Epidermis in Profilstellung, wenn Präparate unter dem Deckglas mehrere Stunden im feuchten Raume aufbewahrt werden.

Über die chemische Natur der *Erythraea*-Anthocyanophoren ist eigentlich nichts bekannt. LIPPMAN hält die Anthocyanophoren für

„Schleimballen“, die sich in der Vakuole bilden und allmählich durch Anthocyan färben; er betont aber, daß ein direkter Nachweis der Schleimnatur noch fehlt und daß die „kolloidchemische Struktur und chemische Beschaffenheit der Anthocyanophore von *Erythraea* noch weiterer Aufklärung bedarf.“ Nach KÜSTER (1935, 315) könnten sie vielleicht durch wolkenartig suspendierte Entmischungsprodukte in stark viskosem oder gallertigem Zellsaft vorgetäuscht werden. Die im Obigen aufgezeigte optische Anisotropie spricht eigentlich nicht für eine schleimige Beschaffenheit der Anthocyanophore. Obwohl die Beobachtung innerhalb der Epidermiszellen erschwert ist und die Cuticularstreifung leicht eine Struktur des darunter liegenden Anthocyanophors vortäuschen kann, so wird doch an den Anthocyanophoren bisweilen eine längsfaserige Struktur schwach angedeutet sichtbar; sie erinnern dann morphologisch einigermaßen an die von KÜSTER (1934) als „anisotrope Fibrillenbündel“ aufgefaßten Eiweißkristalloide von *Epiphyllum*. Da nach SPIESS (1904) und CHAZE (1933) Eiweißkristalloide (Aleuron) Anthocyan zu speichern vermögen, so könnte eine eiweißartige Beschaffenheit der Anthocyanophoren in Betracht gezogen werden, doch fielen die Eiweißreaktionen nicht positiv aus; auch ist es nicht allzu häufig, daß Eiweißkristalloide in wasserreichem Zellsaft auftreten, obwohl auch solche Fälle bekannt sind (MOLISCH 1923, 368, MEYER 1920).

Von einer Reihe durchgeführter Reaktionen, die aber keine besonderen Aufschlüsse gaben, seien nur folgende angeführt: Weder in Silbernitratlösung noch in Osmiumsäure tritt Schwärzung der Anthocyanophoren ein. In Ammoniaklösung färbt sich der Anthocyanophor zunächst blau, der umgebende Zellsaft gelb, dann verschwindet der Anthocyanophor unter vorübergehender Lichtblaufärbung des Zellsaftes. In Eisenchloridlösung werden die Anthocyanophoren schwarz. Bei schwacher Plasmolyse (in Harnstofflösung) zeigt die convexe Plasmolyseform an, daß das Cytoplasma und der Zellsaft leicht flüssig sind, bei starker Plasmolyse zwingt der feste Anthocyanophor dem sich ihm eng anliegendem Cytoplasma die Form auf.

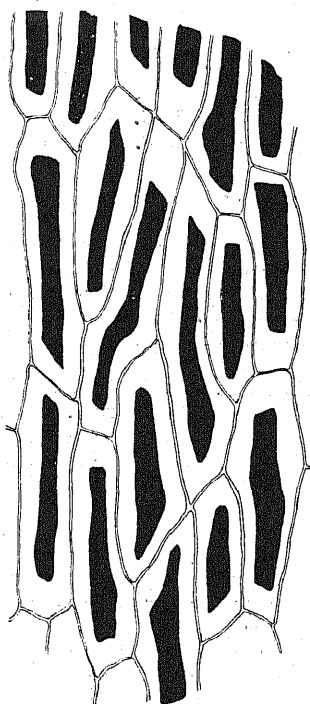
Die Anthocyanophoren von *Erythraea* färben sich vital mit Neutralrot, allerdings ziemlich langsam und wenig intensiv; gar nicht färbt sich meist der Raum um die Anthocyanophoren, das ist nach der herrschenden Ansicht der Zellsaft, in dem sie liegen. Es wäre allerdings möglich, daß bei geeigneter H-Ionenkonzentration (vergl. STRUGGER 1936) sich auch eine Färbung des „Zellsaftes“ einstellt.

Der Gestalt nach stellen die *Erythraea*-Anthocyanophoren im Flächenbilde stets die verkleinerte Form der Zelle dar (Textfig. 1). In dieser Hinsicht besteht also eine vollkommene Übereinstimmung

mit den Anthocyanophoren von *Pulmonaria* (WEBER 1936). Dies legt den Gedanken nahe, daß auch die *Erythraea*-Anthocyanophoren durch Zellsaft-Synaerese entstanden sein könnten. Durch allmähliche Bildung von „Schleimballen“ im Zellsaft läßt sich wohl kaum die gesetzmäßige Beziehung der Gestalt der Anthocyanophoren zu der Zellform erklären. Es wäre von Interesse, ob Fälle bekannt sind, daß Gelkörper, die durch Synaerese wasserärmer geworden sind, anisotrop werden können. Daß auch die Anthocyanophoren von *Pulmonaria* bisweilen anisotrope Strukturen aufweisen, hat WEBER (1936) beschrieben.

Überraschend ist, daß selbst durch relativ starkes Zentrifugieren die Anthocyanophoren nicht aus ihrer normalen Lage in der Zelle gebracht werden. Entweder unterscheiden sie sich im spezifischen Gewicht nicht wesentlich von dem umgebenden „Zellsaft“ oder aber sie sind irgend wie in Verbindung mit dem Cytoplasma in ihrer Lage fixiert. Nicht selten zeigen die Anthocyanophoren in der Flächenlage seitlich eine kreisförmige Einbuchtung, in der der Zellkern liegt. Etwas Analoges wurde für die Anthocyanophoren von *Pulmonaria* beschrieben (WEBER 1936, Fig. 3).

So ergibt sich in Hinblick auf die bisher so wenig beachteten Gebilde der Anthocyanophoren eine Reihe noch offener Fragen besonders in Bezug auf ihre Genese und chemische Natur. Mangel an Material erzwingt den vorzeitigen Abschluß dieser Untersuchung; wenn sie auch mehr Fragen aufwirft als beantwortet, so wird sie vielleicht doch das Interesse für die in der cytologischen Literatur wenig erwähnten Anthocyanophore lenken.



Textfig. 1. Epidermiszellen des Kronblattes von *Centaurea umbellatum*. Die Anthocyanophoren (schwarz) zeigen die gleiche Form wie die Zellen, in denen sie liegen.

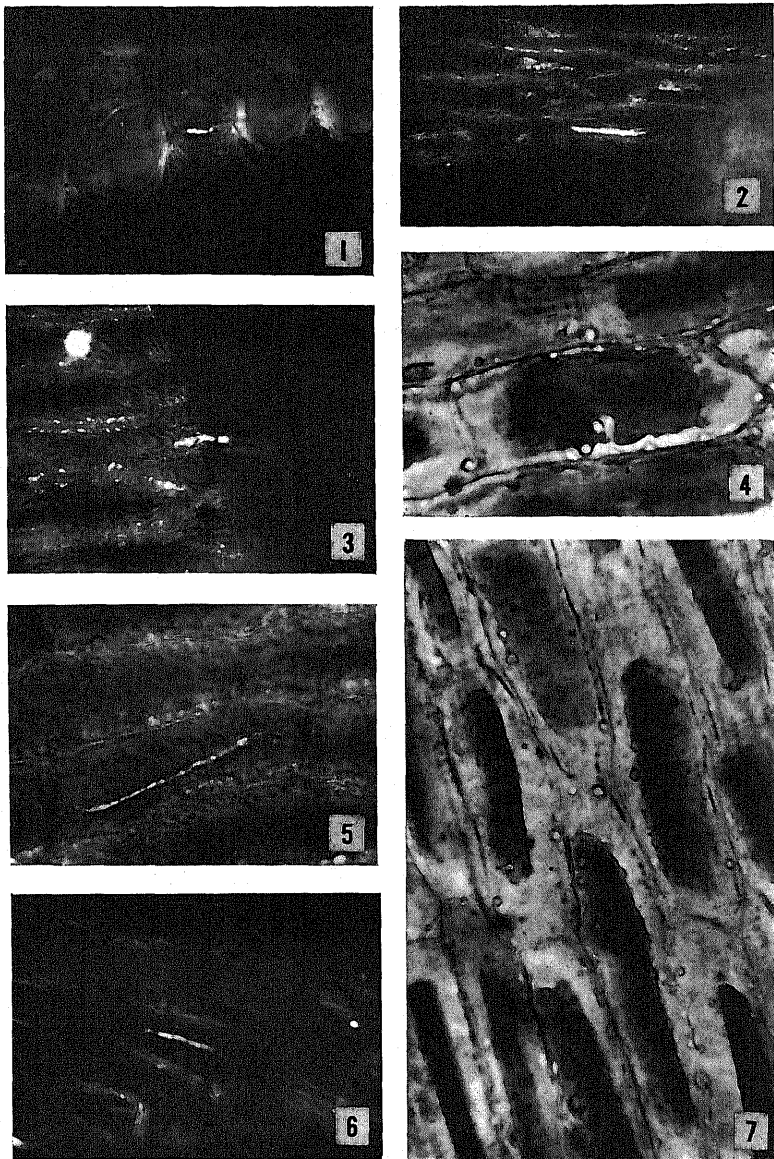
Literatur

- Chaze, J. 1933. Sur la présence de pigments anthocyaniques dans les grains d'aleurone de certaines Graminées. C. R. Ac. Sc. Paris 196.
 Gicklhorn, J. und Weber, F. 1926. Über Vakuolenkontraktion und Plasmolyseform. Protoplasma 1.
 Guilliermond, Mangelot, Plantefol 1933. Traité de Cytologie Végétale. Paris.

- Guilliermond, A. 1934. Recherches cytologiques sur les pigments anthocyaniques. Rev. Gén. Bot. 46.
- Küster, E. 1934. Anisotrope Fibrillenbündel in Pflanzenzellen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 52.
- 1935. Die Pflanzenzelle. Jena.
- Lippmaa, Th. 1926. Die Anthocyanophore der *Erythraea*-Arten. Beih. Botan. Ctrbl. 43, I. Abt.
- Meyer, A. 1920. Analyse der Zelle. Jena.
- Molisch, H. 1923. Mikrochemie der Pflanze. III. Aufl. Jena.
- 1928. Über einen neuen Fall eines Anthocyanophors in der Fruchtoberhaut von *Gunnera chilensis*. Protoplasma 3.
- Politis, J. 1911. Sopra speciali corpi cellulari che formano antocianine. Atti Accad. Lincei Rend. 20.
- 1914. Atti Istituto Botanico R. Univ. di Pavia. 14.
- Scharinger, W. 1936. Cytologische Beobachtung an Ranunculaceen-Blüten. Protoplasma 25.
- Spieß, K. v. 1904. Über die Farbstoffe des Aleurons. Österr. Botan. Zeitschr. 54.
- Strugger, S. 1936. Beitrag zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26.
- Weber, F. 1934. Vakuolenkontraktion der Borraginaceen-Blütenzellen als Synaërese. Protoplasma 22.
- 1936. Vakuolenkontraktion und Anthocyanophoren in *Pulmonaria*-Blütenzellen. Protoplasma 26.

Erklärung der Tafel 15

1. Epidermiszellen von *Erythraea* im Querschnitt in polarisiertem Lichte. In der Mitte der mittleren Epidermiszelle leuchtet der durchschnittene Anthocyanophor auf.
- 2, 5, 6. Epidermiszelle von *Erythraea* Flächenbild im polarisierten Lichte; in je einer Epidermiszelle leuchtet der in Profilstellung befindliche Anthocyanophor auf.
3. Rand eines Epidermisfragmentes. Aus einer verletzten Zelle ragt ein Teil eines Anthocyanophors heraus; dieser in Profilstellung befindliche Teil leuchtet im polarisierten Lichte hell auf.
4. Anthocyanophor in Flächenstellung in gewöhnlichem Lichte. Der lichte kreisförmige Fleck am unteren Rande ist im Anthocyanophor für den Zellkern ausgespart.
7. Anthocyanophoren in länglichen Epidermiszellen, gewöhnliches Licht.



Weber: Über die Anthocyanophoren von *Erythraea*

Etude caryologique du *Carica Papaya*

par
A. Eichhorn

Les Passifloracées n'ont pas jusqu'ici retenu l'attention des caryologistes et l'on ne possède que peu de renseignements à leur sujet. Aussi l'occasion m'ayant été fournie de posséder des graines de *Carica Papaya*¹⁾, ai-je étudié le mode de division nucléaire et dénombré les chromosomes chez cette espèce. Il est aisé d'effectuer cette numération car les plaques équatoriales, en vue polaire, sont très claires, les chromosomes sont parfaitement distincts les uns des autres et régulièrement disposés sur un même plan, puis, surtout, ils sont relativement peu nombreux. Dans les cellules somatiques on en compte, en effet, 18. Ces dix-huit chromosomes sont petits, en forme de V aux branches largement évasées et ils paraissent tous de même taille. Quant à la composition du noyau au repos et à l'évolution nucléaire, elles présentent quelques caractères particuliers. Dans l'ensemble on a affaire à un noyau dépourvu de réseau mais porteur de prochromosomes et la mitose répond à celle propre aux noyaux de ce type. Néanmoins, à l'inverse des cas de ce genre, bien connus maintenant, le nucléole, dans le noyau au repos en interphase, n'est pas unique et l'on rencontre, en plus de l'élément habituel volumineux, sphérique et central, un, deux, trois, quatre ou même cinq nucléoles secondaires, comparativement assez gros, sphériques eux aussi et placés tantôt contre le nucléole principal, tantôt épars dans l'enclenchement nucléaire. Leur taille seule permet de les distinguer des prochromosomes situés à la périphérie, contre la membrane nucléaire, et qui sont d'un volume plus réduit. Les nucléoles secondaires n'atteignent que rarement la taille du nucléole principal dont ils dérivent comme on va le voir, et se distinguent aussi de lui par l'absence habituelle des corps annexes. J'ai déjà eu l'occasion d'indiquer que le nucléole volumineux des noyaux sans réseau présente un ou parfois plusieurs petits corps annexes, pouvant atteindre ou dépasser la taille des prochromosomes, se distinguant de ceux-ci d'une part grâce à leur localisation sur le nucléole ou proche de lui, et, d'autre part, — surtout dans les cas douteux —, par le fait qu'ils ne se colorent pas par le Feulgen. Or, on retrouve ici, sur le nucléole

1) Les graines fraîchement cueillies m'ont été obligeamment envoyées par M. Stehlé, Directeur du Jardin d'essais de Pointe à Pitre, auquel je suis heureux d'adresser mes remerciements.

principal, ces corps annexes qui pourraient bien être considérés comme les ébauches des nucléoles secondaires. En effet, ceux-ci apparaissent par bourgeonnement sur le nucléole principal, bourgeonnement dont on peut suivre tous les stades et qui aboutit à l'expulsion d'une masse nucléolaire d'assez fort volume. Ce phénomène qui peut se reproduire un certain nombre de fois, si l'on en juge par la présence, dans certains cas, de plusieurs nucléoles secondaires dans le suc nucléaire, est particulièrement intense dans les noyaux de la zone méristématique; il est moins prononcé dans les tissus plus âgés.

Que deviennent, au cours de la cinèse le nucléole principal et les nucléoles secondaires? En prophase, les prochromosomes grandissent et se transforment peu à peu en chromosomes qui atteignent, à la fin de ce stade, leur taille définitive. Pendant ces lentes modifications, les nucléoles ne subissent aucun changement de forme. Au moment de l'installation des chromosomes en plaque équatoriale le nucléole principal se divise parfois en deux, par étranglement médian, chacune des portions émigrant ensuite vers un pôle pour se dissoudre, apparemment, dans le cytoplasme. Mais ceci ne paraît pas être la règle car les images de cette sorte sont rares ici. Bien plutôt, il me semble que, d'une façon générale, le nucléole principal se dissout sur place à la métaphase. Par contre, les nucléoles secondaires demeurent et sont entraînés avec les chromosomes lors de leur déplacement vers les pôles, durant l'anaphase. Il est possible, d'ailleurs, de reconnaître leur présence, à ce stade, en effectuant une différenciation un peu poussée. On distingue alors, en vue de profil, un petit nucléole à chacune des extrémités de la bande anaphasique. En télophase, on retrouve ces mêmes nucléoles qui grossissent et fusionnent ensuite pour redonner le nucléole unique du noyau quiescent. On pourrait ainsi admettre que les nucléoles accomplissent un cycle évolutif, comme c'est le cas pour les chromosomes, et l'on peut se demander si tout nucléole ne dérive pas d'un nucléole, tout comme chaque chromosome provient d'un chromosome préexistant. La question de l'individualité des nucléoles se poserait alors de la même façon qu'elle s'était autrefois posée pour les chromosomes.

(Laboratoire de Culture du Muséum, Paris)

An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei in the Resting Stage

By

Namio Shinke

Botanical Institute, Kyoto Imperial University

The structure of the nucleus in the resting stage, an important problem in karyology not only from the mere morphological point of view but also from the genetical stand point, has been receiving special attention from investigators and has frequently been discussed from somewhat earlier days of karyological investigation, and as yet no unanimous conclusion has been attained. In the cases where the nucleus shows a distinct structure, the recent advances in this field of karyology seem to show that there is left little doubt on the view of the nucleus being a structure essentially composed of convoluted chromatin threads or chromonemata (SCHIWAGO, 1926, BÉLAŘ, 1930, TELEŻYŃSKI, 1930, KUWADA and NAKAMURA, 1933-34, FUJII and YASUI, 1936, KUWADA, 1936 and others). But the cases where the nuclei show indistinct structure with all possible grades up to the completely hyaline state have been also observed in both plants and animals. And a question is now raised as to whether there are structural differences of fundamental importance among these nuclei with different appearances. In the present paper some results of experiments we obtained concerning this question are reported.

Material

In the course of an experimental investigation with living nuclei, it was found that a great diversity in visibility of the structure of the healthy or intact nucleus is shown among different species and tissues and also according to the different physiological functions of the cells. The plants and animals or the tissues observed can be classified, referring to the presence or absence of the visible structure of the nucleus, into the following two groups.

a) With the nucleus showing no visible structure except for a nucleolus or nucleoli which are generally visible.¹⁾ *Solanum lycopersicum* (hairs of the leaf), *Primula malacoides* (do.), *Pharbitis Nil* (do.), *Elodea densa* (epidermis of the leaf), *Vicia faba* (guard cells of open or closed stomata), *Dahlia variabilis* (do.), *Tradescantia virginica* (do.), *Zebrina pendula* (do.), and *Rhoeo discolor* (do.).

1) In certain plants small chromocenters are also visible.

b) With the nucleus showing a structure more or less clearly visible. *Cucurbita pepo* var. *Toonas* (hairs of the leaf), *Gynura aurantiaca* (do.), *Elodea densa* (epidermis of the leaf), *Vallisneria asiatica* (do.), *Hydrilla verticillata* (do.), *Allium cepa* (inner epidermis of a scale of the bulb), *Tradescantia reflexa* (staminate hairs, epidermis of the young petals), *T. virginica* (hairs of the leaf, guard cells of half-open stomata), *Ceratopteris thalictroides* (guard cells of half-open stomata), *Vicia faba* (do.), *Dahlia variabilis* (do.), *Sagittaria sinensis* (do.), *Zebrina pendula* (do.), *Rhoeo discolor* (do.), and *Triturus pyrrhogaster* (intestinal epithelium).

In the experiments reported below these two kinds of nuclei mentioned above, the giant nuclei in the salivary gland of the larvae of *Chironomus dorsalis* and *Drosophila virilis*, and the first spermatocyte nuclei in *Tryxalis nasuta* were employed as material.

Experiments and Results

When intact nuclei belonging to one or the other of the groups given above are put in a hyper- or a hypotonic medium such as the solution of saccharose, glucose, urea, NaCl, KNO₃ or CaCl₂ in different concentration, or RINGER's balanced solution in different dilutions, they undergo a marked change in visibility of the structure. A structure may become visible or disappear. These changes are reversible. That the changes are caused chiefly by the hydration or the dehydration¹⁾ of the nuclear elements is evident from the fact²⁾ that with a hypertonic medium 1) increase in the refractive index of the nucleus, 2) decrease in the nuclear volume, 3) stoppage of the Brownian movement and the streaming in the cytoplasm, and 4) occurrence of the plasmolysis (in the case of plant cells) are observed, while with a hypotonic medium the reverse changes take place. Thus it can be learned from the above that the homogeneity or the heterogeneity in appearance of the nuclear structure is chiefly due to the hydration grade of the nuclear elements. By the hydration and dehydration experiments the living nuclei can be classified into the following four types.

1) The terms "hydration" and "dehydration" are not used here in the strict colloid-chemical sense. They merely mean the "Wasseraufnahme" and "Wasserabnahme" respectively, each of which is accompanied with an increase or decrease in volume.

2) The special action of a neutral salt on the karyoplasm which has been studied by STRUGGER (1930), YAMAHARA and ISHII (1932), and SHIGENAGA (verbal information, briefly published in the paper by KUWADA, 1932) is negligible in this case, because such an action is to be observed only in the case where the semipermeability is lost at least to a certain extent (cf. STROHMEYER, 1935).

Type 1. The nucleus which belongs to this type exhibits no visible structure in its healthy condition. When it is observed in an isotonic solution (Fig. 1)¹⁾ it appears to be quite hyaline except for a nucleolus or nucleoli which are visible in the medium of liquid paraffin also. When it is dehydrated with a hypertonic solution, it comes to show a remarkable shrinkage which brings it into a completely homogeneous mass with no visible nucleoli (Fig. 2), while it shows little change in structure when treated with a hypotonic solution. The nucleus in this dehydrated state recovers its original swollen appearance, when transferred into the isotonic medium, without showing any heterogeneity during the process of swelling (Fig. 3). For the sake of convenience, this type of nucleus is designated here as the homogeneous nucleus I. Examples are found in the following plants: *Elodea densa*, *Solanum lycopersicum*, *Primula malacoides* and *Pharbitis Nil* in the tissues given above in brackets.

Type 2. In this type the healthy, intact nucleus is quite similar in its external appearance to the nucleus of the first type, any heterogeneity being not perceptible (Fig. 4) generally except for the nucleoli which are visible, but the use of a hypertonic solution can reveal the difference between the two types. While in Type 1 the nucleus shows no structure when put in a hypertonic solution, it shows chromonemata in the second type with more or less distinctness (Fig. 5). By the immersion in a more highly hypertonic solution, however, the chromonemata become obscure again, the nucleus becoming smaller and highly refractive, as shown in Fig. 6. We call the nucleus of this second type the homogeneous nucleus II, and the homogeneous nucleus which is obtainable by the dehydration of the nucleus of the second type or the homogeneous nucleus II we call the homogeneous nucleus III.²⁾ Examples in which the homogeneous nucleus II is found: *Elodea densa*,³⁾ *Vicia faba* (guard cells of closed stomata), *Tradescantia virginica* (do.), *Zebrina pendula* (do.), *Dahlia variabilis* (do.) and *Rhoeo discolor* (do.).

1) When definite concentrations of the plasmolysing agents are used, the nucleus and the cytoplasm show similar appearances to those presented by them when liquid paraffin is used as medium. These concentrations are taken as being isotonic in the present investigation.

2) The result we obtained in *Elodea densa* is quite in accord with that obtained by STROHMAYER (1935) in the same plant, though the author has made no account of the nuclei belonging to Types 1 and 3 in this plant.

Recently DOYLE and METZ (1935) have reported that the nucleus in the salivary gland of *Sciara* is optically homogeneous (the chromocenter excepted which is visible) in the isotonic RINGER's solution and heterogeneous in the hypertonic RINGER's. This result suggests that the nucleus in the salivary gland of this animal belongs probably to our Type 2.

3) In the tissue already given above.

It is of course hardly possible to draw a sharp line between Type 1 and Type 2. An intermediate type was observed incidentally in which the nucleus showed a cloudy or somewhat heterogeneous appearance in hypertonic solutions instead of the distinct image of chromonemata.

Type 3. In this third type the nucleus presents a heterogeneous appearance more or less distinctly in the normal condition as shown in Figs. 7 and 10. We call this type of the nucleus the heterogeneous nucleus (Type 3). In this type the results from the treatment with hypotonic solution are, as a rule, different in plant and animal cells (except the guard cells of stomata of some plants) owing to the fact that in the former the cell wall pressure prevents sufficient penetration of water into the cells to cause the disappearance of the nuclear structure.

a) In the plant cells, the nuclear structure disappears under the action of hypertonic solutions, and a remarkable shrinkage of the nucleus occurs at the same time (the homogeneous nucleus III, Fig. 8),¹⁾ while it suffers, at most, only a little change in hypotonic solutions (Fig. 9). Examples: *Ceratopteris thalictroides*, *Sagittaria sinensis*, *Gynura aurantiaca*, *Elodea densa*, *Hydrilla verticillata*, *Vallisneria asiatica*, *Allium cepa*, *Tradescantia reflexa* and *T. virginica* (hairs of the leaf).

In the epidermis of *Elodea densa* and in the guard cells of closed stomata of *Vicia faba*, *Tradescantia virginica*, *Zebrina pendula* and some other plants, it is frequently observed that the nucleus exhibits a granular or mottled appearance more or less distinctly. In such nuclei the chromonemata are found not infrequently to be clearly visible when dehydrated. These nuclei may be regarded as an intermediate type between Types 2 and 3.

It must be noted here also that the nuclei which belong to Types 1, 2 and 3 are found even in a single leaf, for example, in the leaf of *Elodea densa*. In Fig. 1, the nuclei *a* and *b* belong to Type 1 and *d* to Type 3 (Type 2 is not shown in this figure).

b) In the animal cells and the guard cells of half-open stomata the nuclear structure becomes invisible by both hyper- and hypotonic solutions in contrast with the case *a* (Figs. 11 and 12). In the hypertonic solution, however, the nuclei considerably shrink (the homogeneous nucleus III), while in the hypotonic solution they swell (the homogeneous nucleus II). In Figs. 10-12, such nuclei of the

1) The disappearance of the nuclear structure by hypertonic solutions has been reported by some authors such as WADA, 1935, STROHMEYER, 1935, PÉTERFI and KOJIMA, 1936, NAKAMURA (verbal information), and others.

guard cells of a half-open stoma in *Tradescantia virginica* are exemplified in osmotically different solutions. In the case shown in Fig. 10 the stoma is put in the isotonic glucose solution, and the chromonemata are visible distinctly throughout the nucleus (the heterogeneous nucleus, Type 3); In the case of Fig. 11 it is put in a hypertonic glucose solution (the homogeneous nucleus III), and they are indistinct. The nuclei in the latter figure closely resemble in appearance those of fully-open stomata (compare Fig. 11 with Fig. 14). When these nuclei are brought back to a hypotonic solution, the chromonemata become visible again for a short time but soon disappear (the homogeneous nucleus II), while the nuclei of the subsidiary cells and those of the other epidermal cells show, in the same treatment, distinct chromonemata which never disappear in the ultimate result (case *a*, Fig. 12). Examples of this guard cell nuclear type: *Vicia faba* (guard cells of half-open stomata), *Dahlia variabilis* (do.), *Tradescantia virginica* (do.), *Zebrina pendula* (do.), *Rhoeo discolor* (do.), *Triturus pyrrhogaster*, *Tryxalis nasuta*, *Chironomus dorsalis* and *Drosophila virilis*.

The salivary gland chromosomes in the *Chironomus* larvae show the same behaviour towards the hydration and dehydration as that displayed by the chromonemata of the resting nucleus of Type 3, *b*. These chromosomes are always found confined in the nucleus with one or two nucleoli. They are of the banded structure as are those observed in some other diptera larvae. The bands which are visible in the medium of liquid paraffin or the body fluid are of different thickness and are positive to FEULGEN's stain (cf. YASUI, 1935). In a concentrated RINGER's solution, the nuclei shrink and become homogeneous, both chromosomes and nucleoli being no longer visible. In a diluted RINGER's, on the contrary, the nuclei swell, markedly. The peripheral part of the nucleolus swells as well, and it becomes evident that in this peripheral region there are a number of minute particles of a somewhat angular shape. When this part of the nucleolus becomes enormously swollen, the particles appear to be set free and dispersed throughout the karyolymph. In this state, they generally display an active Brownian movement. The chromosomes also swell and become increased in volume, the outline being rendered more and more indistinct. In this stage of swelling, we can see only some small number of chromatic bands within the territory of the swollen chromosome. During the process of swelling some thick bands undergo a remarkable change in structure. They look as if they consisted of rows of minute, globular granules which

are probably chromatic.¹⁾ The general aspect of the bands now reminds us of pieces of pearl necklace arranged side by side. The chromatic granules show, not infrequently, a weak vibration movement. In Fig. 13, the pearl necklace structure of a chromatic band is shown (marked with an arrow). The further hydration taking place renders even these chromatic granules invisible, it being soon followed by the complete disappearance of the nucleolus or nucleoli. In this stage of swelling, the nucleus appears to be of a completely homogeneous structure except for a certain number of minute particles being visible frequently, particles which are derived from the peripheral part of the nucleolus. The ground substance of the nucleus is now fluid in its consistency as indicated by the active Brownian movement of these particles suspended in it. When these nuclei are gradually dehydrated with the isotonic RINGER's solution, the nucleolus and the chromosomes reappear. An especially interesting and important phenomenon in this reversible change is that the chromatic bands which have disappeared in the hypotonic solution generally reappear in the original positions in the chromosomes. This fact leads us to the conclusion that in the swollen chromosomes the chromatic substance has not been dispersed far beyond its territory even in the case where the nucleus appears to be an optically homogeneous fluid structure.

Type 4. The nucleus belonging to this type is found often in the guard cells of fully-open stomata of *Vicia faba*, *Tradescantia virginica*, *Zebrina pendula* and *Rhoeo discolor*. As has been reported by WEBER (1927), the nucleus in a fully-open stoma is highly refractive and often shows an uneven contour (Fig. 14). The chromonemata are obscurely visible in a liquid paraffin medium (the homogeneous nucleus III). They become distinct in a hypotonic solution, but in a hypertonic solution no change is exhibited (Fig. 15). In the former solution, they are again rendered obscure by a prolonged immersion.²⁾ The nucleus is finally of a homogeneous structure, but now appear to be less light refractive than before the experiment. It resembles very much in appearance that found in a closed stoma (the homogeneous nucleus II—Fig. 16). It may be concluded, therefore, that the homogeneity of the nucleus in this fourth type is only

1) In the salivary gland nucleus of *Sciara*, DOYLE and METZ (1935) and METZ (1935) have reported that the granular structure of the chromatic band is visible only in degeneration or shrinkage of the nucleus. According to the result we obtained these chromatic granules are observed at a certain period during the process of swelling of the chromosomes or shrinkage of swollen chromosomes.

2) This change in structure of the guard cell nucleus has been observed also by Mr. IMAMURA in the open stomata in *Zebrina pendula* immersed in water (verbal information).

of an apparent nature due to the lack of sufficient difference in refractive index between the chromonemata and karyolymph to make them distinct enough. In the nucleus of Type 2, too, the same is the case. But the difference between these two types 2 and 4 is found in this that in the former, the lack of difference in the refractive index is due to the hydration of the chromonemata, while in the latter it is due to the dehydration, especially that of the karyolymph.¹⁾

The guard cell nucleus in the open stoma frequently shows the chromonemata with a certain distinctness in the medium of liquid paraffin. In the hypotonic solutions, the chromonemata become more clearly visible. This nucleus may be regarded as of an intermediate type between Types 3 and 4.

The descriptions given above are based on the results obtained by observation made with the bright field illumination. In the dark-field illumination with the cardioid condenser, the homogeneous nucleus is, as a rule, hardly bright except for the nuclear membrane and the contour of the nucleolus, and the nucleus showing distinct chromonemata in it in the ordinary illumination appears to be filled with a larger number of minute bright granules (cf. KUWADA and NAKAMURA, 1934, b), though the intensely bright cell wall and cell inclusions often preclude observers from the critical observation of the nuclear structure.

It must be also noted here that the interphasic nucleus differs from the resting nucleus in no point of importance so far as the hydration and dehydration experiments are concerned.

In connection with the results of experiments given above some few lines may be added about the changes in the structure of the guard cell nuclei which take place in association with the stomatal movement. In his study of the stomata in *Vicia faba*, WEBER (1927) has found that in the stomatal movement a "Sol-Gel-Umwandelung" takes place in the guard cell nuclei. This phenomenon is very interesting from the view point that the nuclear appearance may change in a close association with the change in the physiological functions of the cell. In connection with the present investigation the phenomenon was re-observed in *Vicia faba*, and the result was confirmed further in *Tradescantia virginica*, *Zebrina pendula* and *Rhoeo discolor*. In these plants, the nuclei of the guard cells are shrunk and highly light-refractive in the fully open state of the stomata, but in the closed state, they are swollen and transparent. In both open and closed states it is rather of general occurrence that a distinct struc-

1) The case reported by KAMNEV (1934) of the nuclei of the intestinal epithelium (amphibia) seems to belong to our Type 4, because these nuclei show a distinct structure when treated with a hypotonic solution.

ture or often even any structure is hardly visible in the nuclei. As has been already described above, the characteristic feature of the nucleus, observed in the open stomata can be obtained by applying a hypertonic solution to the nuclei in closed stomata and that observed in the closed stomata by immersing open stomata in a hypotonic solution.¹⁾ During these transferring changes from one appearance to the other the nuclei exhibit as a transitory occurrence a distinct chromonema structure which is exhibited in the natural condition in the half-open stomata. According to WEBER, the nucleus is in a gel state in the open stomata, while it is in a sol state in the closed stomata. He is of the opinion that the changes in the nuclear appearance ("Sol-Gel-Umwandelung") occurring associated with the stomatal movement is due to the change in the H-ion concentration in the guard cells. SAYRE (1926), SCARTH (1927) and PEKAREK (1934) show, on the other hand, that the guard cell sap is more alkaline when the stomata are open than when closed. In fact, in closed stomata ammonia causes the nuclear structure to be visible. This is, however, not a direct effect of ammonia, but is considered to be of the result of dehydration of the nuclear substance caused by the swelling of cell sap colloid due to the action of ammonia (cf. SCARTH, 1927). We are at present led to the conclusion that as shown by the results of the experiments we obtained with hyper- and hypotonic sugar solutions, the change in appearance of the nucleus is due to the hydration or the dehydration of the nuclear substance. The well known fact that the osmotic value of the guard cells of open stomata is much higher than that of the cells of closed stomata is in favour of this conclusion (cf. ILJIN, 1915, WIGGANS, 1921). In the open stomata the nucleus will lose its water, as the surrounding cytoplasm has a higher osmotic value than that of the nucleus, but in the closed stomata, the osmotic relation between the nucleus and cytoplasm being reversed, the nucleus will absorb a considerable amount of water from the cytoplasm, thus the nuclear substance is dehydrated in the former and hydrated in the latter.

The disappearance of the nucleolus in the guard cell which WEBER (1925) has observed in open stomata in *Dahlia* seems to represent the case of the nucleolus in the leaf epidermis in *Elodea* or the nucleolus in the closed stoma in *Dahlia variabilis*, where it disappears or becomes indistinct when put in a hypertonic solution.

Finally the result of experiments we obtained with heteropycnotic bodies may briefly be given below. While in the majority of cases the heterogeneous nucleus (Type 3) appears to be of a uniform chro-

1) In the latter change, probably, catatonosis plays a rôle.

monema structure, in some other cases such as in *Triturus pyrrhogaster* (intestinal epithelium), *Cucurbita pepo* var. *Toonas* (hairs of the leaf), *Nuphar japonicum* var. *crenatum* (epidermis of the leaf) and *Rhoeo discolor* (do.), the nucleus shows one or several large chromatic lumps in the living state which may be identified with those structures known as the net-knots or the chromocenters. They differ from the nucleolus in this that they are positive to FEULGEN's nucleal staining to which the latter is negative (cf. HEITZ, 1932, KAMNEV, 1934). While in plants they disappear only in hypertonic solutions, and not in hypotonic solutions owing to a limited penetration of water caused by the cell wall pressure, in animal cells they can disappear in both hyper- and hypotonic solutions. The behaviour of these lumps towards the hyper- and hypotonic solutions shows, therefore, a marked resemblance to that of the chromonemata in the resting nucleus (in plants and animals) and that of the giant chromosomes in the salivary gland nucleus of *Chironomus*. It seems, thus, highly probable that these chromatic lumps, or the net-knots or the chromocenters, represent the heteropycnotic parts of chromosomes, or the whole of such chromosomes, or masses or aggregates of these. In order to prove this view experimentally, an artificial unravelling of these chromatic lumps was attempted (cf. KUWADA and NAKAMURA, 1934, a). The nuclei of *Triturus* and *Nuphar* were treated for several minutes with a 0.5 N. solution of NH_4Cl , instead of the ammonia vapour originally used by KUWADA and NAKAMURA or KCN with which OURA (1936) has also obtained successful results, and were then stained with acetocarmine. The chromatic lumps were unravelled to so great an extent that we could no longer recognize the large chromatic lumps but only small remnant granules (compare Fig. 17 with Fig. 18). From this result of experiments it seems now clear that the chromatic lumps which are identifiable with the net-knots or the chromocenters are the structures representing the heteropycnotic chromosome parts or wholes, or aggregates of these bodies ("Sammelchromozentren"), whichever they may be, those remaining not unravelled in the telophase, or those secondarily brought to the compact state again. The view of HEITZ (1929 and 1932) and KUHN (1929), that the chromocenters are certain portions of chromosomes which are in the condensed state even in the resting nucleus, is in accord with the results of the experiments mentioned above.

Conclusion

In respect to the colloidal state of the resting nucleus in which the distinct structure is hardly perceptible in its healthy condition, we have two conflicting opinions. While STRUGGER (1930), GRAY

(1931) and some other authors are inclined to the view that such a nucleus is in the homogeneous sol state, that is, the state in which the chromatin particles disperse homogeneously in the karyolymph, MARTENS (1927), SAKAMURA (1927), NĚMEC (1929), FUJII (1931), KUWADA and NAKAMURA (1934, b), MORITA (1935), ZEIGER (1935), STROHMEYER (1935), KUWADA (1936) and others have advocated the view that the optical homogeneity of the nucleus is merely a seeming one, the reticulate or the chromonema structure being maintained without undergoing any fundamental change. The main ground on which the former view is based is the less viscous consistency of the nuclear substance which is concluded from the results of micro-dissection experiments (CHAMBER, 1924), or indicated by the Brownian movement of the suspended particles (LEPESCHKIN, 1925, STRUGGER, 1930) or the movement of the nucleolus, taking place in the nuclear substance (GRAY, 1931, LINSBAUER, 1932). But the result of the experiments with hypo- and hypertonic solutions showing that in the salivary gland chromosomes of *Chironomus* the chromatic bands of the chromosome can retain their original positions in the chromosome even in the case where the nucleus is brought to a quite homogeneous, and fluid condition as indicated by the Brownian movement taking place, favours the view that the low viscosity of the nuclear substance does not necessarily mean the true homogeneity of the nuclear colloid. Moreover, the results we obtained, (1) that the homogeneous nucleus II (Type 2) and the homogeneous nucleus III (Type 4) are rendered heterogeneous merely by dehydration and hydration respectively, (2) that the heterogeneous nucleus (Type 3) is transferred into the homogeneous nucleus II (Type 2) by hydration and into the homogeneous nucleus III (Type 4) by dehydration, (3) that these changes are quite reversible, and (4) that the nucleus of the guard cells of stomata undergoes marked changes in association with the osmotic changes in the cells, lead us to the conclusion that the homogeneity of the nuclei, whichever the type may be, the homogeneous nucleus II or the homogeneous nucleus III, is only an apparent one due to the refractive index of the chromonemata being so close to that of the karyolymph as to render them invisible. In the present investigation no case has been found where the homogeneity of the nucleus implies no state other than the homogeneous sol. The homogeneous nucleus I (Type 1), which, contrary to the homogeneous nucleus II (Type 2), presents no distinct structure during the course of the dehydration, may be regarded as one being in such a homogeneous sol state. But we have observed in *Elodea* that both the homogeneous nucleus I and the homogeneous nucleus II, and also the heterogeneous nuclei (Type 3) are found all together

in a single leaf even in company with a number of the nuclei which may be regarded as representing the intermediate type between Type 1 and Type 2. From this fact it seems unlikely that the difference between the homogeneous nucleus I (Type 1) and the homogeneous nucleus II (Type 2) is of a fundamental nature, but it seems that it is rather a question of degree. In both cases, the chromonemata must be hydrated at least to such an extent that little difference in refractive index is shown between them and the karyolymph. But the hydration degree may be different between the two cases, so that in the case of the homogeneous nucleus I, the chromonemata and the karyolymph are dehydrated with equal ease, and therefore, no marked difference in refractive index is produced between them, hence no structure is presented during the course of the dehydration, while in the homogeneous nucleus II, the chromonemata lose water more easily on dehydration than the karyolymph, and therefore, the chromonemata become more light refractive than the karyolymph, hence a heterogeneous structure becomes visible. The difference in the ease of dehydration may thus be regarded as that which distinguishes the two nuclei, and no fundamental structural difference seems to exist between them.

The tentative conclusion which we can draw from the results of the present investigation may be briefly stated as follows:

The essential components of the resting or metabolic nucleus are the chromonemata and the karyolymph. When the chromonemata are evenly hydrated throughout the whole length, the nucleus may be apparently homogeneous (the homogeneous nucleus I and the homogeneous nucleus II), but if all other short segments or portions remain less hydrated so as to present the pearl necklace structure throughout the whole length of the chromonemata, the whole nucleus will appear to be of a granular structure. If in the resting stage, certain parts of chromonemata or the whole of them are in a compactly coiled state, or several such chromonemata (chromosomes) come together to form a large compact mass, they may be regarded as the net-knots or chromocenters of various sizes. The distinct chromonemata are visible only when they are in a more dehydrated state evenly throughout the whole length than the karyolymph (the heterogeneous nucleus, Type 3). If the nuclear dehydration is more pronounced in degree, the nuclear structure is rendered again obscure, owing to the fact that the refractive index of the karyolymph approaches that of the chromonemata (the homogeneous nucleus III).

In no fundamental point does the so-called interphasic nucleus differ from the resting or metabolic nucleus, and the conclusion is the same for the former as for the latter.

Summary

1) The treatments of various plant and animal cell nuclei with hypo- and hypertonic solutions show that the healthy or intact nuclei can be classified into four types according to the behaviour of the morphological components of the nucleus towards hydration or dehydration. In all these nuclei the essential components are the chromonemata which assume a loosely winding form giving the reticulate appearance to the general view of the nucleus or a compactly coiled form appearing as the net-knots or chromocenters, and the karyolymph. The optical homogeneity of the intact nuclei is due to the lack of difference in the refractive index between the two components, the chromonemata and the karyolymph.

2) The salivary gland nuclei of the *Chironomus* larvae are found to belong to Type 3 of our classification. When they are observed in the medium of liquid paraffin, several giant chromosomes which are of a banded structure are observed. When treated with a hypotonic solution, the chromosomes swell markedly and the chromatic bands are transformed into a necklace structure or rows of granules which disappear by further hydration. When these swollen nuclei are dehydrated, the chromatic bands reappear in the original positions in the chromosomes.

3) The hydration and dehydration experiments made with the guard cell nuclei of stomata in several plants show that these nuclei undergo marked changes in appearance responding to the osmotic pressures of the solutions applied. The same changes can be observed also in the natural state in close connection with the functional changes taking place in the guard cells.

4) The net-knots or the chromocenters which in some plants and animals are observable in the living nucleus can be experimentally transformed into a loose mass of uncoiled chromonemata. They may, therefore, be regarded as representing the parts of chromosomes in heteropycnosis or complete chromosomes in the same condition, or aggregates of these, in all of which the chromonemata remain more or less tightly coiled, instead of being in the loosely and irregularly coiled state.

It is a great pleasure to the writer to take this opportunity of expressing his sincere gratitude to Prof. Y. KUWADA under whose kind guidance and direction the present investigation was carried out.

Literature Cited

- Bělař, K. (1930): Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. III. Ztschr. f. Zellforsch. u. mikrosk. Anat., Bd. 10.

- Chambers, R. (1924): The physical structure of protoplasm as determined by microdissection and injection. *Cowdry's General Cytology*. Chicago.
- Doyle, W. L. and C. W. Metz. (1935): Structure of the Chromosomes in the Salivary Gland Cells in *Sciara* (Diptera). *Biol. Bull.*, Vol. 64.
- Fujii, K. (1931): Cytology in the Past and Present (Japanese). Iwanami-Koza.
- and K. Yasui. (1936): Cell Structure and Cell Division (Japanese). Hattori Hokenkai Kenkyushoroku, II.
- Gray, J. (1931): *Experimental Cytology*. Cambridge.
- Heitz, E. (1929): Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. *Ber. d. D. Bot. Ges.*, Bd. 47.
- (1932): Die Herkunft der Chromocentren. *Planta*, Bd. 18.
- Iljin, W. S. (1915): Die Regulierung der Spaltöffnungen im Zusammenhang mit der Veränderung des osmotischen Druckes. *Beih. Bot. Centralbl.*, (I), Bd. 32.
- Kamnev, J. E. (1934): Der Einfluß von Hypo- und Hypertonischen Lösungen auf die Struktur und Vitalfärbung der Epithelzellen des Amphibiendarmes (*Rana temporaria*, *Triton taeniatus*). *Protoplasma*, Bd. 21.
- Kuhn, E. (1929): Die Beziehung der Chromocentren zur Chromosomenbildung. *Ber. d. D. Bot. Ges.*, Bd. 47.
- Kuwada, Y. (1932): The Life-cycle of Chromosome. (Japanese). *Kagaku*, Vol. 2.
- (1936): On the Structure of the Cell Nucleus. (Japanese). *Ztschr. d. Jap. mikrobiol. Ges.*, Bd. 30.
- Kuwada, Y. and T. Nakamura. (1933): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. I. *Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ. Ser. B.*, Vol. 9.
- (1934 a): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. II. *Cytologia*, Vol. 5.
- (1934 b): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. III. *Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ. Ser. B.*, Vol. 9.
- Lepeschkin, W. W. (1925): Morphologische Eigentümlichkeiten der roten Blutkörperchen im Lichte der Kolloidchemie. *Biol. General.*, Vol. 1.
- Linsbauer, K. (1927): Weitere Beobachtungen an Spaltöffnungen. *Planta*, Bd. 3.
- (1932): Kerne, Nucleolen und Plasmabewegungen in den Blasenellen von *Mesembryanthemum crystallinum*. *Sitzber. d. Ak. d. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl. Abt. I.*, Bd. 141.
- Martens P. (1927): Le Cycle du Chromosome somatique dans les Phanérogames. III. *Cellule*, Tom. 38.
- Metz, C. W. (1935): Internal Structure of Salivary Gland Chromosomes in *Sciara*. *Jour. Hered.*, Vol. 26.
- Morita, J. (1935): On the Structure of the Resting Nucleus. II. (Japanese). *Proc. Japan. Assoc. Acad. Sci.*, Vol. 10.
- Němec, B. (1929). Über Struktur und Aggregatzustand des Zellkerns. *Protoplasma*, Bd. 7.
- Oura, G. (1936): A new Method of Unravelling the Chromonema Spirals. *Ztschr. f. wiss. Mikr.* Bd. 53.
- Pekarek, J. (1934): Über die Aziditätsverhältnisse in den Epidermis und Schließzellen bei *Rumex acetosa* im Licht und im Dunkeln. *Planta*, Bd. 21.
- Péterfi, T. und H. Kojima. (1936): Die Wirkung mikrurgischer Eingriffe auf den Ruhekerne der Pflanzenzellen. *Protoplasma*, Bd. 25.
- Sakamura, T. (1927): Chromosomenforschung an Frischem Material. *Protoplasma*, Bd. 1.
- Sayre, J. D. (1926): Physiology of Stomata of *Rumex patientia*. Dissertation (Ohio University).
- Scarsh, G. W. (1927): Stomatatal Movement: Its Regulation and Regulatory Rôle. *Protoplasma*, Bd. 2.
- Schiwago, P. (1926): Über die Beweglichkeit der Fadenstrukturen im lebenden „Ruhekerne“ der Froschleukozyten. *Biol. Zentralbl.*, Bd. 46.
- Strohmeyer, S. (1935): Beiträge zur Experimentellen Zytologie. *Planta*, Bd. 24.
- Strugger, S. (1930): Beitrag zur Kolloidchemie des pflanzlichen Ruhekerne. *Protoplasma*, Bd. 10.

- Teleżyński, H. (1930): Le Cycle du Chromosome somatique. I. Acta Soc. Bot. Poloniae, Vol. 7.
- Wada, B. (1935): Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. III. Cytologia, Vol. 7.
- Weber, F. (1925): Der Zellkern der Schließzellen. Planta, Bd. 1.
- (1927): Cytoplasma- und Kern-Zustandsänderungen bei Schließzellen. Protoplasma, Bd. 2.
- Wiggans, R. G. (1921): Variations in the osmotic Concentration of the Guard Cells during the Opening and Closing of Stomata. Amer. Jour. Bot., Vol. 8.
- Yamaha, G. und T. Ishii. (1932): Über die Ionenwirkung auf die Chromosomen der Pollenmutterzellen von *Tradescantia reflexa*. I. Cytologia, Vol. 3.
- Yasui, K. (1935): On the Structure of the Chromosome in the Salivary Gland Cell of *Drosophila melanogaster*. Cytologia, Vol. 6.
- Zeiger, K. (1935): Zum Problem der vitalen Struktur der Zellkernes. Ztschr. f. Zellforsch. mikro. Anat., Bd. 22.

Explanation of Plates

Plate 16

All the photomicrographs were taken with a LEITZ's Makam using a LEITZ homog. imm. obj. 1/12 and a LEITZ periplan oc. 8.

Figs. 1, 2 and 3. The same piece of young leaf epidermis of *Elodea densa* (the nuclei, Type 1).

Fig. 1. Mounted with spring water. Photo. at 7.23 p.m. Nuclei *a* and *b* are of the structure of the homogeneous nucleus I, and *d* is a heterogeneous nucleus (Type 3). In *c*, a mitotic figure in metaphase is shown.

Fig. 2. In the medium of 0.5 mol sucrose solution in place of the spring water. Photo. at 7.30 p.m. Chromosomes and all the nuclear components are invisible.

Fig. 3. With the medium replaced again with spring water. Photo. at 7.40 p.m. The original appearance of the nuclei and the chromosomes are recovered.

Figs. 4, 5 and 6. The same closed stoma in leaf epidermis of *Tradescantia virginica* (the nuclei, Type 2).

Fig. 4. In the medium of 0.2 mol sucrose solution. Photo. at 10.48 a.m. Nuclei of the guard cells are hardly recognizable (the homogeneous nuclei II).

Fig. 5. In 0.8 mol sucrose solution. Photo. at 11.01 a.m. Chromonemata are visible in the nuclei (the heterogeneous nuclei).

Fig. 6. In 1.6 mol sucrose solution. Photo. at 11.32 a.m. The nuclei shrink and present no distinct structure (the homogeneous nuclei III).

Figs. 7, 8 and 9. The same piece of young petal epidermis of *Tradescantia reflexa* (the nuclei, Type III, *a*).

Fig. 7. In 0.05 N. NaCl solution. Photo. at 9.40 a.m. Chromonemata are very distinct (the heterogeneous nuclei).

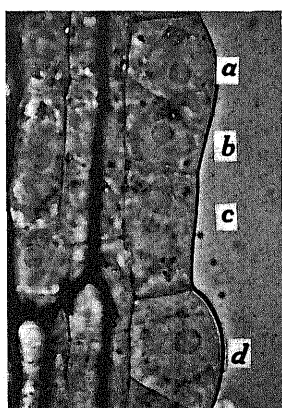
Fig. 8. In 0.5 N. NaCl solution. Photo. at 9.55 a.m. The nuclei decrease in volume and increase in refractive index accompanied by disappearance of chromonemata (the homogeneous nuclei III).

Fig. 9. In di-distilled water. Photo. at 10.15 a.m. The original appearance of the nuclei is recovered (the heterogeneous nuclei).

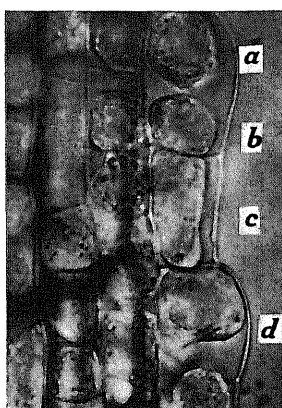
Plate 17

Figs. 10, 11 and 12. The same half-open stoma of *Tradescantia virginica* (the nuclei, Type III, *b*).

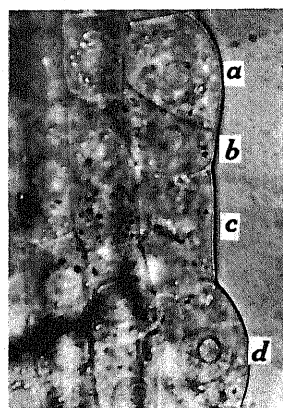
Fig. 10. In 0.4 mol glucose solution. Photo. at 10.00 a.m. Chromonemata in the guard cell nuclei are very distinct (the heterogeneous nucleus).



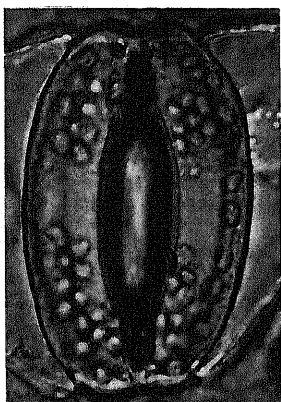
1



2



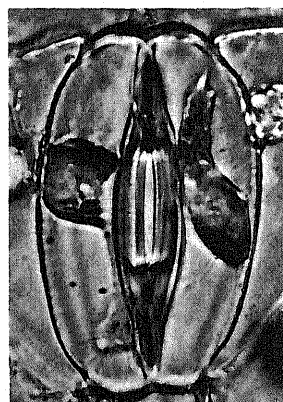
3



4



5



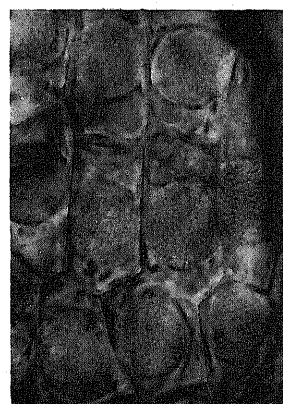
6



7



8



9

Shinke: An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei
in the Resting Stage



10



11



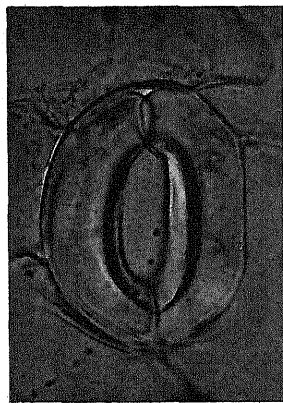
12



14



15



16



13



17



18

Shinke: An Experimental Study on the Structure of Living Nuclei
in the Resting Stage

- Fig. 11. In 0.8 mol glucose solution, photo. at 10.05 a.m. The nuclei shrink and exhibit no distinct chromonemata (the homogeneous nuclei III).
- Fig. 12. In di-distilled water, photo. at 10.35 a.m. The nuclei swell. The chromonemata are not visible. They were visible for a short time before photographing.
- Fig. 13. A salivary gland cell nucleus of *Chironomus dorsalis* observed in a diluted RINGER's solution (containing ca. 0.33% NaCl). The arrow indicates chromatic granules in linear arrangement in the swollen chromosome.
- Figs. 14, 15 and 16. The same fully-open stoma of *Vicia faba* (the nuclei, Type 4).
- Fig. 14. In 0.5 mol solution of glucose. Photo. at 2.10 p.m. Guard cell nuclei show no visible structure (the homogeneous nucleus III).
- Fig. 15. In di-distilled water. Photo. at 2.15 p.m. The chromonemata are distinct (the heterogeneous nucleus).
- Fig. 16. In the same medium. Photo. at 2.23 p.m. The nuclei are nearly homogeneous (the homogeneous nucleus II).
- Figs. 17 and 18. Nuclei of intestinal epithelium of *Triturus pyrrhogaster*.
- Fig. 17. From an ordinary acetocarmine preparation. Large netknots are shown.
- Fig. 18. Stained with acetocarmine after treatment with 0.5 mol solution of NH_4Cl for five minutes. Large net-knots are no longer visible.
-

An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells

By

Michio Shigenaga

Botanical Institute, Kyoto Imperial University

Abnormal nuclear and cell divisions have been studied by many workers in bastards and cancer tissues, and also experimentally in plants and animals by treating the tissues with certain narcotics, hypertonic or hypotonic solutions, or high or low temperatures, or exposing to the x-rays or radium rays. The results obtained have been summarized by TISCHLER (1922), POLITZER (1934) and KÜSTER (1935). While almost all these investigations have been carried out with fixed material, some have been made with material in the fresh or living state. MAINX (1924) has observed abnormal divisions caused by the action of quinine, strychnine, caffeine, nicotine, etc. in the living mouth epithelium of *Salamandra maculosa* and in the staminate hairs of *Tradescantia pilosa*. BECKER (1933) has reported an occurrence of the abnormal division in the vital staining of staminate hair cells of *Tradescantia virginica* with methylene blue and neutral red, and has also observed the influence of ether on nuclear division. BĚLAŘ (1929) has studied the action of hypertonic sugar solutions on nuclear division in the young petal cells of *Tradescantia virginica*, and recently WADA (1936) has also published his investigation on the action of the same solutions on the staminate hair cells in *Tradescantia reflexa*. The latter author (WADA, 1932, 1935) has also reported the abnormal nuclear division caused by sticking the cells with a micro-needle. STROHMEYER (1935) has studied the actions of chloral hydrate and a hypertonic solution of KNO_3 on nuclear division in the young leaf and the leaf hair cells in *Tradescantia virginica*. In the animal tissue culture, ROSENFELD (1932, 1933) has studied the effect of ammonia and ether on mitosis, and M. R. LEWIS (1934) has observed the effect of hypotonic solutions, the observation being made in both living and fixed materials.

In the present experimental investigation, the effects of certain narcotics and hypertonic solutions upon mitosis were observed in living material in order to see what is the direct cause of rendering the mitosis abnormal.

Material and Method

As material, detached entire young petals of *Tradescantia reflexa* were used. In this material many nuclear divisions in various stages

were found, and the figures in desired stages could be easily obtained. There was in this material another advantage that mechanical injuries were avoided in preparing the material. The observations were made in the usual manner under the cover glass, but with a precaution of getting rid of the influence of the pressure given by the cover glass by inserting small pieces of a cover glass between the slide glass and the cover. In this method of preparation, it was also found convenient to replace one medium with another without doing harm to the material.

The chemicals used in the present investigation were all taken from MERK's or KAHLBAUM's preparations.

In the preliminary experiments, entire flower buds removed from sepals were immersed for different periods of time in the different solutions in vessels which were specially devised to prevent the buds from floating, and also to enable the material to be washed directly in the vessels with running water. In this method, the effects to be shown in the progress of the nuclear division can not be followed, but the end results can be compared with those obtained by the observation under the microscope.

Observation

Preliminary experiments. In order to see in what concentration and in how long treatment, narcotics can give rise to an abnormal mitosis in the *Tradescantia* petal cells, preliminary experiments were made with the immersing method described above. Flower buds were treated with solutions of 0.5% and 0.25% nicotine, 1%, 0.5% and 0.3% chloral hydrate, and 0.5 mol, 0.4 mol, and 0.3 mol sugar¹⁾, and a 1% ethyl alcohol for different periods of time, and the treatments for an hour or a longer period with 0.25% nicotine, 0.3% chloral hydrate, and 0.4 mol and 0.5 mol sugar solutions were found to be suitable to obtain abnormal nuclear divisions. The end results obtained were the formation of di-diploid giant nuclei, bi-nucleate cells, incompletely divided cells or bi-nucleate cells with an incomplete septum, and four nucleate cells.

Experiments with chloral hydrate. Observations were made under the microscope. The material was treated with 0.25%, 0.3%, 0.4% and 1% solutions. In all these treatments the end results were the same, the di-diploid nuclei, the bi-nucleate cells, and the bi-nucleate cells with new septa incompletely formed having been found.

In the treated cells, vacuolization was a characteristic feature of the cytoplasm. In the resting stage and the prophase, the vacuoli-

1) In all the experiments saccharose was used.

zation was accompanied by a diminished volume of the nucleus, a clear presentation of the nuclear structure, and an increased degree of light refractivity. In the metaphase, the spindle area was smaller than that found in the normal mitosis, though such was not always the case. When it was nearly of the normal size, the metaphase usually proceeded normally. In the anaphase the connecting spindle was so thin and long that it represented a thread stretching out between the two chromosome groups. As examples, detailed descriptions from some of the experiments will be given below.

The photomicrographs shown in fig. 1, Pl. 18 are reproductions of those taken in the experiment made with a 0.3% solution. The experiment was commenced at 10.30 a.m. In the upper cell of the two middle ones in the figure, the mitosis was at metaphase, when the first observation was made. At 11.00 a.m. the spindle area was somewhat smaller than in the normal case (fig. 1a). The metaphase proceeded to anaphase (fig. 1b: 11.30 a.m.), but the spindle was contracted, and the two groups of the daughter chromosomes were soon brought together into one (fig. 1c: at noon) which presented an appearance of a nucleus in the late prophase (cf. STROHMEYER, 1935). At this stage the medium was replaced with a 0.2 mol sugar solution. The chromosome group diminished still more in volume, but the signs of chromosome unravelling were soon shown (fig. 1d: 1.00 p.m.). With an attainment of a greater dilution of the medium, however, the process of reconstruction or the chromosome unravelling proceeded by and by, being accompanied with an increase in volume, and finally a giant di-diploid resting nucleus was formed (fig. 1e: 3.30 p.m.).

In the same preparation, a bi-nucleate cell with an incomplete cell membrane (the lower cell in fig. 1) was formed. In this case, the mitosis proceeded rather normally to anaphase and telophase (figs. 1, a and b), showing the formation of a rudimentary cell plate, but the phragmoplast was not able to grow wider on both sides toward the periphery of the cell, so that a complete cell plate was not formed. After the medium was replaced with the 0.2 mol sugar solution, the daughter nuclei with unravelled chromosomes approached each other and came into contact, the incompletely formed cell plate being not clearly visible (fig. 1d). The two nuclei finally were seen to be in a complete resting stage, and the incomplete cell membrane became clearly visible again (fig. 1e).

Another case of the bi-nucleate cell was observed in the same preparation¹⁾. In this case, too, the nuclear division was normal up

1) This case is not shown in fig. 1, Pl. 18.

to the anaphase, and the cell was found to be normal except for the vacuolization occurring in the cytoplasm, but at the telophase the phragmoplast was very thin and long and light refractive just as that shown in fig. 2a, though much shorter than that shown in the figure. The thready phragmoplast was then torn and the two sister groups of chromosomes were disconnected. When the medium was replaced with the 0.2 mol sugar solution, the chromosomes began to unravel and came to the resting stage. The two nuclei were in contact with each other. In certain similar cases, such nuclei were so close to each other that they represented a di-diploid nucleus of the shape of a dumb-bell which was strongly compressed along its long axis, as shown by WADA (1932) and STROHMEYER (1935) in the experiments they carried out. In some other cases, however, the nuclei were observed to separate from each other again after coming together, and in no case were the two nuclei observed completely fused up, so far as our experiments are concerned.

When the experiment was commenced at the late prophase or early metaphase, the diminution of spindle area by contraction was stronger than when commenced at the metaphase proper, so that the metaphasic chromosome group was rounded up. It appeared like a prophasic nucleus in the late stage. No clear anaphase figure was presented in this case (cf. fig. 1c), and with the process as described above, a di-diploid nucleus was formed when the medium was replaced with a hypotonic solution or water.

When the experiments were commenced at the anaphase and the early telophase, chromosomes migrated normally to the poles, but the formation of the cell plate was not quite normal, only a rudiment having been observable. When the chromosome unravelling proceeded through the replacement of the medium with the 0.2 mol sugar solution, the two daughter nuclei approached each other to come in contact, but without fusing, and a bi-nucleate cell was formed, the rudiment of the septum having completely disappeared. The same case has been reported by WADA (1936).

Besides such abnormal mitoses as mentioned above, there were also found mitotic figures which proceeded normally, if the medium was replaced with a hypotonic solution by which the spindle is hydrated. Even in these cases of the normal mitosis the replacement of the medium was a necessary requirement for the further progress of mitosis, i.e. the telophasic reconstruction.

It has been often reported that the prophasic nucleus shows a regression towards the resting stage during observation. In the present observation, only some were found to show it when the medium was replaced with water.

In all the experiments given above the replacement of the medium with the 0.2 mol sugar solution was made. When in the early anaphase no such replacement was made, the chromosome groups diminished continually in volume, finally resulting in a highly refractive, homogeneous di-diploid chromosome mass of a smaller size (figs. 6, a-d). In the case of no replacement being made, a vacuole or vacuoli may be found in the chromosome mass as illustrated in fig. 6d. In the case where a bi-nucleate cell was formed, too, non-replacement of the medium resulted in a gradual diminishing in volume of the two nuclei which had shown the appearance of the normal resting nucleus¹⁾ and the final result was the formation of two homogeneous, light refractive nuclear masses. The resting nucleus, too, became smaller, and highly light refractive in the affecting medium.

The chromosome unravelling can be realized by the replacement of the affecting medium with water also, more rapidly than in the case when the medium was replaced with the 0.2 mol sugar solution. Some idea about the time relation between the two cases may be acquired from the examples given in the following table. In all the cases shown in the table, the original medium used was 0.4% chloral hydrate.

Medium replaced with	Obs. com'd. in metaphase at	St. cor'g. to Fig. 1c (u) at	Medium replaced at	St. cor'g. to Fig. 1d (u) at	St. cor'g. to Fig. 1e (u) at
0.2 mol sugar solution	10.50 a.m.	11.10 a.m.	12.00	1.40 p.m.	6.00 p.m.
water	2.30 p.m.	3.00 p.m.	4.15 p.m.	5.15 p.m.	6.00 p.m.
	in metaphase at	to Fig. 6b at		to Fig. 6c at	to Fig. 6d at
no replacement	11.20 a.m.	3.00 p.m.		7.00 p.m.	10.00 p.m.

Abbreviations: Obs. com'd.=Observation commenced; St. cor'g.=Stage corresponding; (u)=upper cell.

Putting briefly what we mentioned above, we may say that the chromosomes treated with chloral hydrate can be unravelled in any stage in mitosis at which the mitotic process is suspended under the action of the chemical, by the replacement of the medium with a hypotonic sugar solution or water. It must be noted here, however, that in some cases no unravelling takes place, so that the chromosome groups may form homogeneous masses, as in the case where the replacement of the medium is not made.

1) This telophasic unravelling in the affecting medium seems to be due to the fact that the artificial dehydrating action is temporarily overcome by the natural hydration tendency of the telophasic chromosomes, though a continuous action of artificial dehydration can bring them into homogeneous masses as in the case of the di-diploid chromosome mass derived from early anaphase by continuous dehydration.

Experiments with nicotine and caffeine. A 0.25% nicotine and a 0.25% caffeine solution affected the nuclear division in the same manner as chloral hydrate, with the production of bi-nucleate cells and di-diploid giant nuclei as end-results. That means, therefore, the nuclear division may take place or may not, while the cell membrane formation is suppressed in either case.

In the case of the 0.25% nicotine, a dislocation of nuclei due to the abnormal vacuolization in the cytoplasm was often observed. Sometimes the vacuolization caused also a rotation by 90° of the system of the two sister nuclei between which no septum was formed as a result of the influence of the solution. When the vacuoles grew larger, the nuclei diminished in volume and became highly refractive. In certain cases, the vacuolization was found occurring in the equatorial region. In such cases, the two nuclei which were highly light refractive and even appeared as homogeneous masses were found held against the cell walls on opposite sides.

The most interesting phenomenon observed in this nicotine experiment was the relationship existing between the cell membrane formation and the water content in the kinoplasm. The early anaphasic chromosomes proceeded to telophase, but the connecting spindle (phragmoplast) was found stretching between the two nuclei as a very thin, light refractive, thready body (fig. 2a). The final result was the formation of the bi-nucleate cell, the membrane formation having been entirely suppressed (fig. 2b). But when the medium was replaced with water, the thin, thready phragmoplast swelled, and the cell plate was formed, the division proceeding normally (fig. 3). Even when a rudimentary cell plate was noticeable at the telophase, it soon disappeared under the continued action of nicotine, and a bi-nucleate cell was formed.

In the case of the 0.25% caffeine where bi-nucleate cells and di-diploid giant nuclei were also formed through the same processes as in the cases of chloral hydrate and nicotine, the metaphasic(?) chromosome group could unravel to form a resting nucleus, even when the solution was not replaced with water or the hypotonic sugar solution (figs. 5, a-c). Putting it in other words, the dehydration did not take place so severely in this case of caffeine as to have inhibited the chromosome unravelling. In this solution, too, the resting nucleus also showed a diminution in volume, but in a lesser degree than in the other solutions. The di-diploid giant nucleus produced may be of a dumb-bell shape, the anaphasic separation of sister chromosomes being incomplete (figs. 4, a-c). It remains undetermined, at present, whether such a nucleus is ultimately transformed into a round shape or not.

In the experiments with caffeine, the unravelling of prophasic chromosomes was easily observable, provided the medium was replaced with water or the hypotonic sugar solution.

Experiments with other narcotics. By the treatment with alcohol and chloroform the bi-nucleate cells were also produced as in the cases mentioned above. In our experiments, however, a di-diploid giant nucleus could not be obtained. This negative result seems to be due to wrong time durations taken for the treatment, or wrong concentrations of the chemicals used. When the material was treated with 7.5% alcohol, bi-nucleate cells were produced, even when a rudimentary cell plate was visible in a late stage of mitosis. The process of formation of the bi-nucleate cell is illustrated in fig. 7 (a-d). Chloroform was used in the four times dilution of the saturated water solution, or a dilution which corresponds approximately to 0.2%. This solution caused a high degree of vacuolization in the cytoplasm. Under the action of this solution bi-nucleate cells were also formed as illustrated in fig. 8 (a-d).

By the treatment with 1%, 2% and 2.5% ether, the nuclear division proceeded normally, and no abnormal division was found, if the medium was replaced after about half an hour's immersion in ether, although the cytoplasm was found vacuolated in a high degree as in the case of chloroform. NATHANSON (1900) and ROSENFELD (1933) have, on the other hand, obtained abnormal nuclear divisions with ether. The reason why ether did not cause an abnormal division in the present experiment is left for a future investigation.

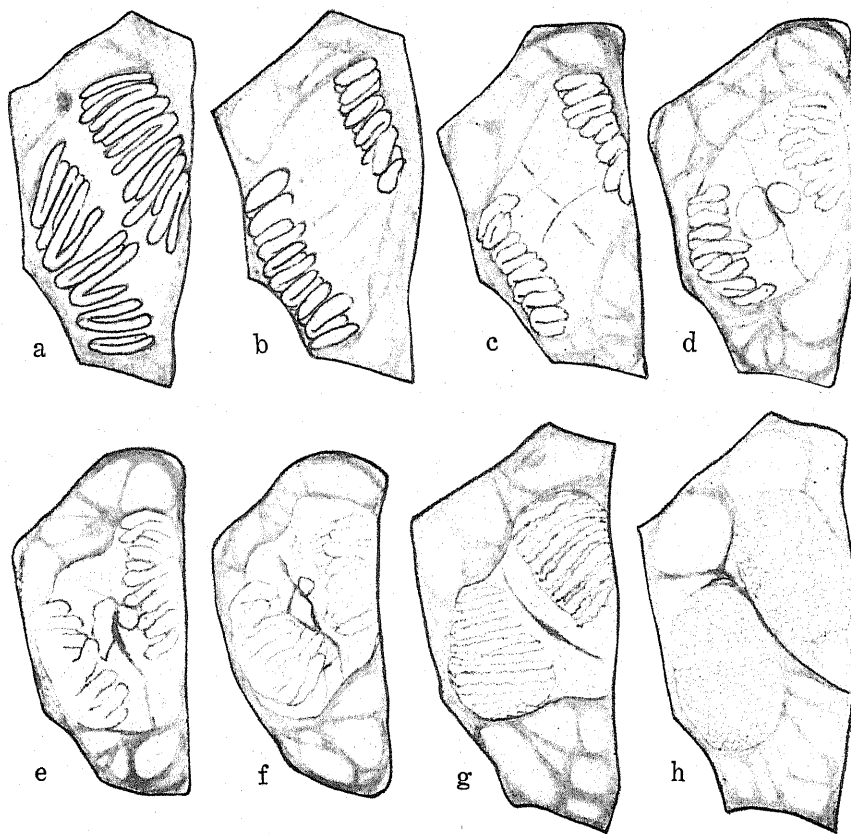
Experiments with sugar solutions. The results of the experiments mentioned above are regarded as showing that the abnormal nuclear division and the chromosome unravelling are caused simply by a change in water relation, the change being in its result dehydration in the former and hydration in the latter¹⁾. To confirm this view, experiments were made with hypertonic and hypotonic sugar solutions.

While in a 0.1 mol and a 0.15 mol sugar solution and in water, metaphasic as well as late prophasic chromosomes were found to divide normally, the chromosomes in the middle or early prophase were liable to be unravelled and to present the appearance of the resting stage, though in other cases, they were divided through the normal process of mitosis, it being accompanied with the normal cell division. The tendency of the prophasic unravelling was stronger, when the solution used was more dilute. In 0.2 mol and 0.25 mol

1) The terms, hydration and dehydration, are used here and in other places in this paper loosely to denote the changes in water-content above and below the normal.

solutions, the nuclear division proceeded generally though the whole normal course from the very early prophase to the resting stage. In these cases, the telophasic reconstruction or the chromosome unravelling took place more easily and more quickly when the solution was more dilute, and the division process from metaphase to the resting stage took a longer time when the solution was more concentrated.

When a 0.3 mol sugar solution was used, the metaphase or the late prophase proceeded normally to the early telophase, but the telophasic reconstruction or the chromosome unravelling was suspended (text-fig. 1). In this telophase the individual chromosomes



Text-fig. 1. Camera drawings. a-f, in 0.3 mol sugar solution; g-h, after replacement of the medium with water.

could be observed. When the medium was replaced with water, the chromosome unravelling soon occurred, and the normal cell division took place generally. Schematical sketches reproduced in text-fig. 1 show the successive stages in the sugar solution (text-fig. 1, a-f), and the telophasic reconstruction taking place after the replacement of

the medium with water (text-fig. 1, g and h). In the case here illustrated, the replacement of the medium did not result in the sufficient swelling of the connecting spindle (phragmoplast), and only the incomplete cell membrane was formed. When the nucleus in an earlier prophase was treated with the 0.3 mol solution, the result was the same as in the cases of the late prophase and metaphase. When the nucleus in late prophase was treated with a 0.4 mol solution, the mitosis was suspended nearly at the metaphase, and did not proceed further unless the medium was replaced with water. Only in the replaced medium, it could proceed to telophase and the chromosomes underwent the unravelling to form a nucleus with the normal appearance. When the nucleus in metaphase was treated with the same solution, the mitosis stopped, and only at the replacement of the medium with water, it proceeded to telophase and the unravelling took place. In a prolonged treatment with the 0.4 mol solution, however, the replacement with water did not result in the progress of the mitotic process toward the telophase, but in a direct chromosome unravelling in the suspended condition as we have seen in the cases of narcotics, and therefore, it resulted in the formation of a di-diploid nucleus. When the treatment was made in the anaphase the mitosis proceeded to telophase, but it remained without showing any sign of the chromosome unravelling. In the cases of the treatment with the 0.4 mol solution mentioned above, the chromosomes were found in a highly dehydrated state before the replacement with water, and individual chromosomes could not be distinguished from one another, the whole group or groups of chromosomes being nearly a homogeneous mass or masses, a clear contrast to the case when the 0.3 mol sugar solution was used. When in either case, treated with the 0.3 mol or the 0.4 mol solution, the medium was replaced with water before the mitosis had proceeded to metaphase, the chromosomes were unravelled and the prophasic nucleus appeared to be a resting nucleus. This phenomenon in the prophase has been observed by STROHMEYER (1935), BECKER (1933) and WADA (1932). It may take place at any stage in the prophase as stated by WADA.

The time interval between the replacement of the medium with water and the beginning of the unravelling varies. In the case of the 0.3 mol sugar solution, the unravelling took place immediately after the medium was replaced, when the immersion was made for about one hour; and it took place about half an hour or more after the replacement of the medium, when the immersion was made for about 20 minutes. In this concentration of the solution the mitosis proceeded during this interval of time, and the unravelling was observed to take place at telophase. In the case of a more con-

centrated solution or of a more prolonged treatment the mitosis may be arrested at metaphase as mentioned above.

While these experiments were in progress, the paper of WADA (1936) appeared, in which he has reported the formation of the bi-nucleate cells and di-diploid nuclei by the successive treatment with a 50% and a 2% sugar solution. In our experiments the bi-nucleate cells were easily obtained with 0.4 mol and also 0.5 mol solution, but the case of the di-diploid nucleus was observed only in one case (with 0.4 mol solution).

In the case of the 0.3 mol solution used, the abnormal nuclear division resulting in the formation of the di-diploid nucleus was not observed as already mentioned above, and also no case of the completely bi-nucleate cell was found. Even when the phragmoplast did not grow so wide as to extend to the periphery of the cell, an incomplete cell membrane was formed. In the case when the 0.4 mol solution was used, the normal formation of cell membrane took place in some cases, and not in others, resulting in the production of the bi-nucleate cell. No occurrence of the incompletely bi-nucleate cell was observed in this case, but it seems that it may occur. Non formation of the di-diploid nuclei and bi-nucleate cells, or more generally speaking, non occurrence of the abnormal division seems to be determined by two factors (1) the concentration of the affecting solution and (2) the duration of time of treatment, which both may co-operate in causing the abnormal divisions.

The results we obtained by successive treatments of cells with hyper- and hypotonic sugar solutions are quite in accordance with our conclusion from the results of experiments with narcotics that the abnormal nuclear division and chromosome unravelling are determined by a change in water relation.

In the normal division, too, the chromosome unravelling in the telophase must be connected with the hydration phenomenon as indicated by the increase in volume. An increase in volume seems to take place also in the early prophase nucleus.

Conclusion

The conclusions which BĚLAŘ (1929) came to in his experiments, that in the cells "in die noch kein Zucker eingedrungen ist", the disjunctive movements of the chromosomes in all stages between the metaphase and the late anaphase and their regressive changes in the telophase are suspended, and that "ist soviel Zucker eingedrungen daß die Lichtbrechungsverhältnisse des Protoplasmas wieder einigermaßen normal ist, so werden die Spindeln rückgebildet und die

Chromosomenaggregate wandeln sich in Ruhekerne um", agree with the results we obtained in the present investigation. We may, perhaps, conclude that the decrease in amount of water plays a main rôle in causing abnormal nuclear and cell divisions. The nucleus treated with the chemical agents which cause the abnormal divisions decreases in volume and is rendered highly refractive. The spindle also shows the same characteristic features when treated with these agents. These characteristics are observed also in the experiments with hypertonic sugar solutions. They must show that the nuclear or the spindle substance is highly dehydrated, and this dehydration is regarded as the main cause of producing the di-diploid giant nucleus or the bi-nucleate cell. If the dividing cells or nuclei so treated are not recovered from the abnormal dehydration, both nuclear and cell divisions will stop, the nuclei becoming a mere mass of highly light refractive and homogeneous structure. To continue the further processes of division, especially to accomplish the process of the so-called telophasic reconstruction or the chromosome unravelling and that of the cell membrane formation, it is necessary that they should be supplied again with a sufficient amount of water.

The necessity of water for the chromosome unravelling is readily seen from the fact that the telophasic chromosomes show no accomplished unravelling in the hypertonic solutions, but only when the medium is replaced with a hypotonic solution or water. FUJII and YASUI (1934) have observed that the chromosomes unravel in the hypotonic solution as observable in the case of the transformation toward the resting nucleus, and BECKER (1933) that the telophasic reconstruction is suppressed by methylene blue which acts according to him as a strongly dehydrating agent. In the case of the treatment with caffeine, the di-diploid and bi-nucleate cells are formed without replacement of the medium with water or hypotonic solutions. It seems that in this case of caffeine the unravelling taking place without having replacement of the affecting medium is due to a low degree of dehydration.

The easiness of the vital unravelling of chromosomes by the artificial supply of water seems to depend upon the dehydration degree of the chromosomes themselves. The lower it is, the easier the unravelling takes place. If the dehydration of the cell is not too strong, the process of mitosis can proceed further on, with or without having the replacement of the medium with water or a hypotonic solution according to the degree of the dehydration. In such a case, the artificial unravelling does not take place in the metaphase and anaphase, but most frequently in the telophase, because the mitosis proceeds before the unravelling. If, however, the dehydration is suffi-

ciently strong, the artificial unravelling by the replacement of the medium takes place in the condition in which the mitosis is suspended. Meanwhile no further progress takes place in the stage of mitosis. In these cases, the chromosomes show the highly dehydrated characteristics.

Even when the hypotonic solution or water is used as medium, if it is directly or alone used, the unravelling does not usually take place within the time during which the combined treatment with hypertonic and hypotonic solutions can realize the unravelling¹⁾. In our experiments, it is shown that in the prophasic nucleus, when the cell is slightly plasmolized by a hypertonic sugar solution, a replacement of the medium with a hypotonic solution or water can give rise to the unravelling easily and quickly, and that the easiness of unravelling depends on the time during which the cell is treated with the hypertonic solution. The reason why such a treatment makes it easy to unravel chromosomes is not clear, but it seems not improbable that the realization of the chromosome unravelling is largely due to the injury of the semipermeable plasma membrane which may be brought about by plasmolysis. The case observed by WADA (1932) in which after drying the cell, a prophasic chromosome unravelling took place in the medium of a hypotonic sugar solution may also be regarded as a result of sufficient supply of water due to the injury of the semipermeable membrane caused by the drying.

The necessity of water for the formation of the cell membrane is shown by the fact that it is inhibited by the dehydration of the connecting spindle or phragmoplast. In the dehydrated state, even when a rudimentary cell plate is visible, it disappears and a binucleate cell results. When the medium is replaced with water at an appropriate time, the spindle or phragmoplast swells and the new membrane is formed. When the kinoplasmic body is dehydrated in a certain limited degree, the cell membrane may be formed, but not fully. These facts must show that the cell membrane formation is also closely connected with water content in the kinoplasmic body. According to BECKER (1933) the cell membrane can be formed even in the cell whose nucleus is in the prophase stage, but we met with no such a case.

The formation of the di-diploid giant nucleus and the binucleate cell has been studied under the microscope by several authors, MAINX using narcotics, WADA a hypertonic sugar solution or micro-dissection needles, STROHMEYER a hypertonic KNO_3 solution, and ROSEN-

1) In prophase a prolonged treatment with a hypotonic solution or water alone often causes the unravelling.

FELD ether as the agent causing the abnormal divisions. In his experiments ROSENFELD states: "The clumped chromosomes of metaphase may remain aggregated and swell in situ to form a single nucleus". This statement implies that a nucleus is formed by the hydration of the clumped chromosomes in metaphase as we have seen in our experiments. He further says: "In the vicinity of a dividing cell under study there frequently appear cells with gelated nuclei". It implies that the clumped chromosomes in metaphase may be in a dehydrated state as are the nuclei found in the vicinity of these chromosomes, a statement which is again in accord with the result we obtained. STROHMEYER has also observed an increase in light refractivity of the resting nucleus and in the grade of the "Ent-quellung" of the chromosomes under the influence of chloral hydrate. The case of WADA (1936) where he obtained di-diploid nuclei and bi-nucleate cells by the successive treatments with a 50% and a 2% sugar solution is quite in accord with the case of the experiments we carried out. It seems that the formation of the di-diploid nucleus or the bi-nucleate cell is closely related with the dehydration and hydration phenomena in the spindle and the nucleus.

Many workers such as MAINX (1924), STROHMEYER (1935), WADA (1936) ROSENFELD (1932, 1933) and others have demonstrated the fusion of the two nuclei in a bi-nucleate cell, but in the present investigation, the complete fusion of the two nuclei was in no case observed.

A production of the dumb-bell shaped nuclei or bi-nucleate cells by a mere use of a hypotonic solution (LEWIS; SHIWAGO) or ammonia (MAINX; ROSENFELD) has been reported. In these cases the results have been observed in fixed material, and the figures obtained seem to be rather comparable with those obtainable directly from anaphasic chromosomes by artificial unravelling with ammonia vapour, followed by staining with aceto-carmin (KUWADA and NAKAMURA), than with those produced experimentally or naturally by suppression of the septum membrane formation. According to ROSENFELD ammonia stops the process of nuclear division.

In conclusion we may say: When in mitosis the normal condition in water content of the protoplasm is disturbed by dehydration, the division may stop. In the case of the artificial treatment no chromosome unravelling takes place unless the normal condition of the protoplasm is restored by a sufficient supply of water. By the dehydration of the kinoplasm the chromosome movement toward the poles is suspended or the membrane formation is suppressed, so that a water supply which follows the dehydration results in the formation of the di-diploid nucleus or the bi-nucleate cell.

Summary

1) The di-diploid nucleus, the bi-nucleate cell, and the bi-nucleate cell with an incomplete septum membrane are produced under the action of chloral hydrate, nicotine, caffeine and hypertonic sugar solutions by the succeeding treatment with a hypotonic solution or water.

2) Under the action of ethyl alcohol and chloroform, bi-nucleate cells are also produced with the same after-treatment.

3) The abnormal nuclear and cell divisions resulting in the production of these abnormal nuclei and cells are brought about by dehydration of the kinoplasm (spindle or phragmoplast) followed by hydration of the chromosomes.

4) The dehydration of the kinoplasm gives rise to inhibition of the chromosome migration movement and that of the cell membrane formation.

5) In hypertonic sugar solutions, telophasic chromosomes are not unravelled, the unravelling is only possible when a dehydration is followed by the treatment of the material with a hypotonic solution or water.

6) The division process from metaphase to telophase is more delayed, when the sugar solution used is more concentrated. In a high concentration the division is suspended, and the chromosome unravelling can take place in the suspended condition when a hypotonic solution or water is applied. The suspension of the division is not observed at anaphase.

7) In hypotonic sugar solutions, prophasic chromosomes may be unravelled and the nucleus comes to have the appearance of a resting nucleus. In plasmolized cells, the prophasic chromosomes are unravelled more easily and quickly, provided the medium is replaced with a hypotonic sugar solution or water.

I am grateful to Prof. Y. KUWADA for his kind advice and criticism throughout this investigation.

Literature cited

- Becker, W. A. (1933): Vitalbeobachtungen über den Einfluß von Methylenblau und Neutralrot auf den Verlauf von Karyo- und Zytokinese. Beitrag zur Pathologie der Mitose. Cytologia Vol. 4.
- Bělař, K. (1929): Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. III. Untersuchungen an den Staubfadenhaarzellen und Blattmeristemzellen von *Tradescantia virginica*. Zts. Zellf. mikr. Anat. Bd. 10.
- Fujii, K. and K. Yasui (1934): Cell Structure and Cell Division. (Japanese). Hattori Hokokai Kenkyushoroku, I.
- Küster, E. (1935): Die Pflanzenzelle. Jena.
- Kuwada, Y. and T. Nakamura (1934): Behaviour of Chromomemata in Mitosis. II. Artificial unraveling of coiled chromonemata. Cytologia Vol. 5.

- Lewis, M. R. (1934): Reversible Solution of the Mitotic Spindle of Living Chick Embryo Cells Studied in vitro. Arch. exp. Zellf. Bd. 16.
- Mainx, F. (1924): Versuche über die Beeinflussung der Mitose durch Giftstoffe. Zool. Jahrb. Abt. f. Allg. Zool. u. Physiol. der Tiere, Bd. 41.
- Nathansohn, A. (1900): Physiologische Untersuchungen über amitotische Kernteilung. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 35.
- Politzer, G. (1934): Pathologie der Mitose. Protoplasma-Monographien. Bd. 7. Berlin.
- Rosenfeld, M. (1932): The action of ether on cells in mitosis. Arch. exp. Zellf. Bd. 12.
- (1933): Experimental modification of mitosis by ammonia. Arch. exp. Zellf. Bd. 14.
- Shiwago, P. I., Morozow, B. O. und A. F. Iwanizkaja, (1935): Zytologische Studien über den Einfluß des osmotischen Druckes auf die Zellteilung in Gewebekulturen embryonaler Herzen. I. Einfluß der Hypotonie des Mediums. (Russian, with German summary) Archeves Russes D'anatomie D'histologie et D'embryologie. T. 14.
- Strohmeyer, G. (1935): Beiträge zur experimentellen Zytologie. Planta. Arch. f. wiss. Bot. Bd. 24.
- Tischler, G. (1921-1922): Allgemeine Pflanzenkaryologie. Handbuch der Pflanzenanatomie. Bd. 2. Berlin.
- Wada, B. (1932): Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung I. Die Bildung von Tetraploidkernen, zweikernigen Zellen und anderen abnormen Teilungsbildern. Cytologia Vol. 4.
- (1935): Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. II. Das Verhalten der Spindelfigur und einige ihrer physikalischen Eigenschaften in den somatischen Zellen. Cytologia Vol. 6.
- (1936): Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung. III. Die Einwirkung der Plasmolyse auf die Mitose bei den Staubfadenhaarzellen von *Tradescantia reflexa*. Cytologia Vol. 7.

Explanation of Plates

All the figures are photomicrographs taken with ZEISS' oil immersion 1/12 and ZEISS' comp. oc. 8.

Plate 18

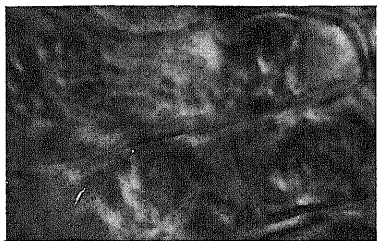
- Fig. 1. a-c. Showing formation of a di-diploid nucleus (upper) and an incompletely bi-nucleate cell (lower) under the action of 0.3% chloral hydrate, d and e. After replacement with 0.2 mol sugar solution.
- Fig. 2. a-b. Showing bi-nucleate cell formation in 0.25% nicotine solution. b. After replacement with water. In a, the phragmoplast is contracted into thready form.
- Fig. 3. Showing septum formation that follows the swelling of the dehydrated phragmoplast in the medium of 0.25% nicotine solution after replacing it with water. The phragmoplast was of a thready form like that shown in Fig. 2a before the replacement of the medium.
- Fig. 4. a-c. Showing formation of a dumb-bell shaped di-diploid nucleus under the action of 0.25% caffeine. b and c. After replacement with 0.1 mol sugar solution.
- Fig. 5. a-c. Showing formation of a di-diploid nucleus under the action of 0.25% caffeine without replacement of the medium.

Plate 19

- Fig. 6. a-d. Showing formation of a homogeneous, light refractive, small di-diploid chromosome mass under the action of 0.4% chloral hydrate without replacement of the medium.
- Fig. 7. a-d. Showing formation of a bi-nucleate cell under the action of ethyl alcohol. b-d. After replacement with water.
- Fig. 8. a-b. The same under the action of chloroform. b-d. After replacement with water.



1a



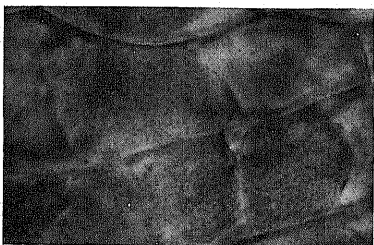
1b



1c



1d



1e



2a



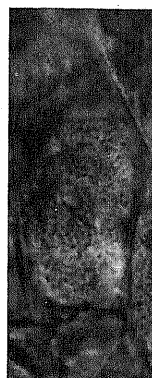
2b



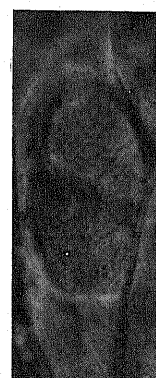
3



4a



4b



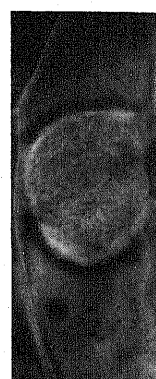
4c



5a



5b



5c

Shigenaga: An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells



6a



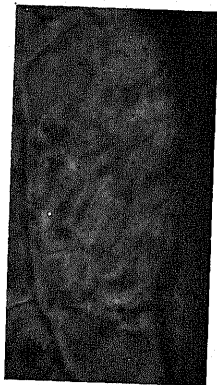
6b



6c



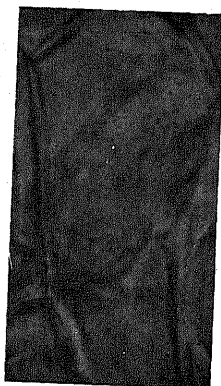
6d



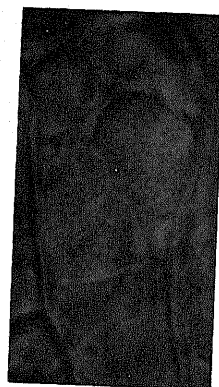
7a



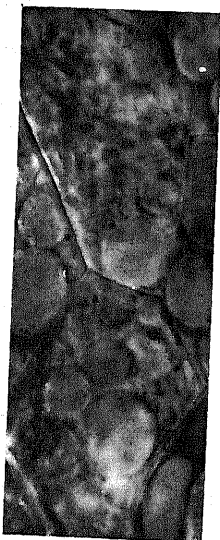
7b



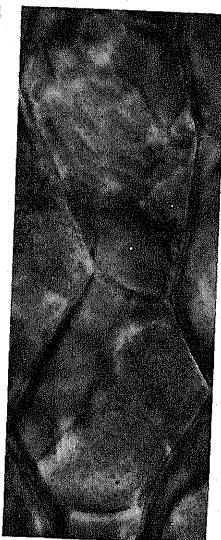
7c



7d



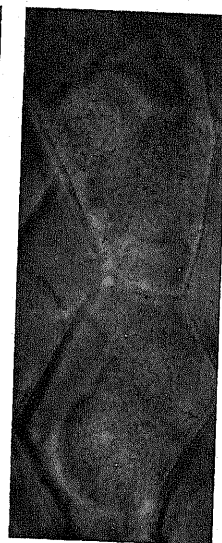
8a



8b



8c



8d

Shigenaga: An Experimental Study of the Abnormal Nuclear and Cell Divisions in Living Cells

Über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum von Gewebekulturen

Von

Albert Fischer

Aus dem Biologischen Institut der Carlsberg Stiftung, Kopenhagen

Die im folgenden mitgeteilten Versuche sollten über die Einwirkung von Neutronen auf das Wachstum in Gewebekulturen orientieren. Bis zum Beginn dieser Versuchsserie war nichts über die Einwirkung von Neutronen auf biologische Objekte bekannt. Während dieser Untersuchung erschienen Arbeiten von J. H. LAWRENCE und E. O. LAWRENCE¹⁾ und R. E. ZIRKLE und P. C. AEBERSOLD,²⁾ die die Einwirkung von Neutronen, die allerdings hier unter ganz anderen Bedingungen und durch außerordentlich große Energiequellen gewonnen wurden, auf Ratten untersuchten.

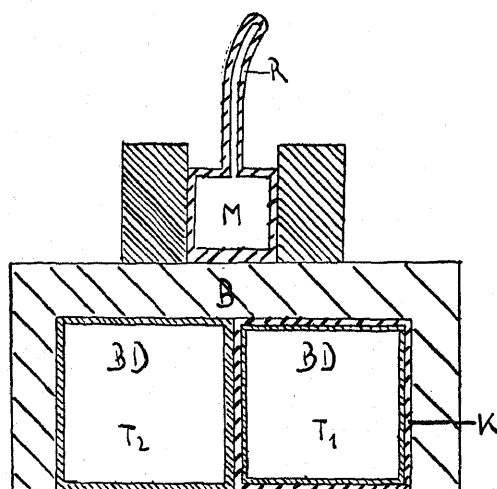
Uns schien die Einwirkung von Neutronen gerade auf Gewebekulturen interessant, weil diese Objekte auf die Einwirkung anderer kleinster Masseteilchen sehr ausgiebig reagieren und uns ein Vergleich etwa mit der Einwirkung von α , β oder γ Strahlen wünschenswert erschien. Wir wollen gleich vorwegnehmen, daß im Gegensatz zu den erwähnten starken Wirkungen geringer Mengen dieser Strahlen,³⁾ unter den von uns gewählten Bedingungen keinerlei Reaktion der Gewebekulturen auf die Einwirkung von Neutronen zu verzeichnen war.

Versuchsobjekte waren Reinkulturen von Herzfibroblasten und Chondrioblasten. Die Kulturen wurden geteilt. Die eine Hälfte wurde als Kontrolle verwendet, die andere Hälfte wurde der Einwirkung der Neutronen ausgesetzt. Die Exposition der Kulturen begann unmittelbar nach dem Einsetzen in das Kulturmedium, bevor noch irgend ein Zeichen beginnenden Wachstums zu bemerken war. Die Expositionsdauer betrug bis zu 72 Stunden. Die Flächenausbreitung der Kulturen wurde in der üblichen Weise alle 24 Stunden planimetrisch gemessen.

Versuchsanordnung: Als Neutronenquelle diente ein Messingbehälter (M), der etwa 5 g Beryllimpulver enthielt. An dem Messingbehälter wurde eine etwa 2 cm lange Kupferröhre (R) von 1 mm lichter Weite angebracht. In diese Bohrung wurde eine Glaskapillare, die Radiumemanation enthielt, eingeschoben. Dann wurde diese Röhre oben zugelötet und durch das Umbiegen derselben die Kapillare

zerbrochen. Dadurch wurde der Zutritt der Emanation zum Beryllium ermöglicht und damit die Neutronenemission in Gang gesetzt. Um uns davon zu überzeugen, daß die Neutronenemission in der von uns gewünschten Weise vor sich ging, d.h. also, daß die Kapillare mit der Emanation auch wirklich zerbrochen und der Messingbehälter für die Emanation undurchlässig war, wurde der Exposition der Kulturen eine physikalische Messung der Neutronenemission vorausgeschickt. Diese Messung verdanken wir der Liebenswürdigkeit der Herren vom BOHRschen Institut. Der Berylliumbehälter war durch eine Bleisäule (B) von den Kulturen getrennt. Dies hatte den Zweck, die Kulturen vor den gleichzeitig entstehenden γ Strahlen, die das Blei nicht durchdringen können, zu schützen und sie nur der

Einwirkung der Neutronen auszusetzen. Die Länge dieser Bleisäule betrug am Anfang 25 cm und wurde bis auf 1 cm verringert. Diesen letzten Zustand haben wir in der nebenstehenden Figur festgehalten. Der eigentliche Kulturbehälter bestand aus einer Bleidoppelkammer (BD), deren ein Teil (T_1) mit Kadmiublech (K) von $\frac{1}{2}$ mm Stärke umgeben war. Diese Kammer diente zur Aufnahme der Kontrollkulturen, da die Neutronen diese Kadmiu-
 aus-



Schematischer Querschnitt durch die Versuchsanordnung ($\frac{3}{4}$ d. nat. Gr.)

kleidung nicht durchdringen können. Als weitere Kontrolle wurden immer Kulturen in denselben Brutschrank in einen besonderen, weit von der Neutronenquelle entfernten Kadmiumbehälter gestellt, der innen mit einer $\frac{1}{2}$ cm starken Bleischicht ausgekleidet war. Die in der Figur skizzierte Anordnung wurde mit einer dicken Paraffinschicht vollkommen umgeben. Dadurch wurde erreicht, daß die Kulturen nicht nur den schnellen Neutronen, die direkt der Quelle entstammten, ausgesetzt waren, sondern einem dichten, sekundär aus dem Paraffin emittierten Neutronennebel. Die Stärke der Emanation, die für die Versuche verwendet wurde, variierte von 82 bis 143 Millicurie.

Die Ergebnisse waren durchaus eindeutig, indem keinerlei Wirkung nachzuweisen war. Ein Vergleich dieses Ergebnisses mit

den Resultaten der genannten Autoren ist wohl kaum zulässig, da ja auch vergleichbare Messungen der Energiemenge und Energieverteilung, die für die biologische Wirkung maßgebend sind, nicht vorliegen. In unserer Versuchsanordnung konnte weder die Zunahme der Stärke der Neutronenquelle, noch die Annäherung derselben an die Kulturen einen Unterschied zwischen dem Wachstum der Kontroll- und Versuchskulturen bewirken. Gerade von diesen Ergebnissen, die wir in zahlreichen Versuchsreihen gewonnen haben und durch die der strikte Gegensatz zwischen der Neutronenwirkung und der Wirkung von α , β und γ Strahlen auf die Kulturen unter denselben experimentellen Bedingungen demonstriert wird, leiten wir eine Berechtigung zur Mitteilung dieses an und für sich negativen Ergebnisses ab. Eine weitere Berechtigung scheint durch die neuartige experimentelle Technik bei derartigen Versuchen gegeben.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich Herrn Prof. Dr. E. BUCH-ANDERSEN (Physik. Inst. der Univ., Aarhus) für seine Anregungen und Hilfsbereitschaft danken.

Die Ausführung dieser Arbeit wurde durch den dänischen Landesverein zur Krebsbekämpfung unterstützt.

Literatur

- 1) J. H. Lawrence u. E. O. Lawrence. The biological action of neutron rays. Proc. Nat. Acad. Science. Washington, 22, 124-133, 1936.
- 2) R. E. Zirkle u. P. C. Aebersold. Relative effectiveness of x rays and fast neutrons in retarding growth. Ebenda, 22, 134-138, 1936.
- 3) Albert Fischer. Mesothoriumbestrahlung von Gewebezellen *in vitro*. Strahlentherapie, 40, 54-96, 1931.
— u. M. Horwitz. Multiplikation der Wirkung kleinster Radiumdosen auf Gewebezellen *in vitro*. Ebenda, 40, 456-469, 1931.
H. C. Andersen u. M. Fischer. Die Wirkung von Strahlen auf Gewebekulturen. Ebenda, 48, 500-507, 1933.

Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections

By

Takeshi Nakamura

Botanical Institute, Kyoto Imperial University

In the previous paper (KUWADA and NAKAMURA, 1934), the results of observation on the double refraction of the chromosomes in both somatic and meiotic divisions in *Tradescantia reflexa*, obtained from smear preparations have been reported. The present paper is to report that the paraffin method can serve as well for the same purpose of observation.

Material and Method

The wall tissue of the anther in *Tradescantia reflexa*, *Fritillaria japonica* and *Narcissus tazetta*, root-tips in *Vicia faba* and *Fritillaria japonica*, and pollen mother cells in *Fritillaria japonica* and *Narcissus tazetta* were employed as material.

The materials were fixed mostly with absolute alcohol alone. Using acetic acid vapour before fixation was also tried. The result was found good, the fixation image being quite useful, if it was used for an appropriately short time. But in prolonged use, the double refraction was no longer recognizable. According to SCHMIDT (1932a), alcohol preserves or intensifies the optical anisotropy of the chromatin in the living cell, or can even make an isotropic chromatin in the living state of the cell anisotropic. It is, however, generally not a good fixative for plant cytological work. Absolute alcohol causes the specimens to shrink to a considerable extent, and therefore, 95%, 75%, 50%, and 30% alcohols were also used on trial, and the results obtained were compared with that obtained with absolute alcohol. The comparison showed that the 75% alcohol was somewhat superior to absolute alcohol, but inferior for the study of the double refraction, except for the case of the wall tissue of the anther and the pollen mother cells. Tests were also made with various kinds of fixatives such as FLEMMING's strong solution without acetic acid, MERKEL's, NAWASCHIN's, BOUIN's, LICENT's, ZENKER's, TELLYES-NITZKY's, CARNOY's, corrosive sublimate (conc. sol.),¹⁾ and some of

1) In smear preparations the nucleus and chromosomes fixed with corrosive sublimate were doubly refractive in diametrical opposition to the statement of SCHMIDT (1928), that when a concentrated solution of corrosive sublimate is added abundantly, the double refraction is immediately abolished. But on addition of alcohol the double refraction disappeared, and accordingly they showed no double refraction in paraffin sections.

these fixatives in combination,¹⁾ to see if there was any that is appropriate for the study of double refraction, but none of them was found useful. According to SCHMIDT (1932a), FLEMMING's solution causes the chromatin to cease to be doubly refractive, and an addition of acetic acid results in an almost immediate cessation of the double refraction. The latter fact has been observed later also by us (KUWADA and NAKAMURA, 1934). PATTRI (1932) has stated that ZENKER's, FLEMMING's and other solutions preserve the inner structure of the sperm head fairly well, but that they destroy its optical anisotropy. Thus the conclusion to which we came was that the double refraction is most clearly shown in the material fixed with absolute alcohol, and that 75% alcohol is fairly good for this purpose only in the case of pollen mother cells and the wall tissue of the anther.

During the course of the present investigation, it was found that the cells containing a great number of doubly refractive bodies such as starch grains were not suitable for the investigation of the optical anisotropy of the nuclei and chromosomes.

The effect of boiling water on the double refraction of chromosomes and nuclei was also examined. For this purpose only root-tips were used as material. They were fixed with absolute alcohol after being treated with boiling water for 60 seconds.

The fixed materials mentioned above were imbedded in paraffin with the usual method. They were cut 5μ or 10μ thick. Relatively thin sections were found satisfactory for the observation of details rather than thicker ones owing to the fact that in the latter there is a great tendency of the optical character of the chromosomes being rendered obscure by the more pronounced anisotropy of the cell membrane.

As the residue of paraffin in the preparations makes it difficult to determine, as pointed out by SCHMIDT (1932c), the double refraction of a material, special attention was paid to the removal of the paraffin residue. The sections were put for two days in xylene, which was kept warm in the paraffin oven during the treatment. They were then transferred into another bottle containing fresh warmed xylene, the mounting with cedar oil then following.

In both observation and photomicrographing a Monla lamp of LEITZ was used for the source of light.

1) The pretreatment with CARNOY's mixture for about half a minute before fixation with absolute alcohol or the chrom-acetic acid mixture gave at times the result in which a very weak double refraction was shown.

Observation

The resting nucleus. According to SCHMIDT (1928, 1932a, 1934) and PATTRI (1932) the double refraction of the sperm head manifests itself in a different manner, depending on the form of the head, rounded or elongated. It is strong in the latter form, and very weak or hardly perceptible in the former. In his studies of the spermiogenesis in *Liogryllus campestris*, *Viviparus viviparus*, and *Bombinator igneus*, PATTRI has obtained the result that while the spermatid nucleus in the early stage where it is of a spherical form and in a swollen state shows no double refraction, the mature and elongated, contracted sperm head exhibits a clear double refraction of the maximum intensity. Somewhat similarly, in the wall tissue of the anther of *Fritillaria* and *Tradescantia* the elongated nuclei are strikingly doubly refractive (Fig. 1 a, b), while those of the spherical shape show only a very feeble double refraction. The polarization colour between crossed nicols is greyish white I.O. in the case of the strong birefringence. According to SCHMIDT (1934) the polarization colour of the sperm is not beyond the limit of greyish white.

There is found no definite relation between the size of the nucleus and the intensity of the double refraction, so far as the present investigation is concerned. This must show that the intensity of the double refraction of the nucleus is not determined by the thickness of the nucleus. On the other hand, the fact that the nuclei elongated by dehydration are generally strongly doubly refractive seems to show that the intensity depends on the degree of shrinkage of the chromatin material due to dehydration.

In most cases the birefringent nuclei show, roughly speaking, a homogeneous and straight extinction between crossed nicols, but sometimes the extinction is not homogeneous, and such cases are rather of a general occurrence when the nucleus is spherical. It is probably due to irregular orientation of the sinuous chromonemata in the nucleus. PATTRI (1932) has observed such a non-homogeneity in extinction in the case of the sperm head in a certain animal. This seems to represent the same case as that of the plant nuclei in which the extinction is not homogeneous. In the case where the nuclei are of a rounded shape, therefore, it is difficult to see to what extent the distribution of the chromonemata is irregular, but we have certain experimental data which may throw some light on the question.

In paraffin sections the nuclei shrink uniformly in all directions, becoming smaller in size as a whole, so that the original shapes, elongated or rounded, are preserved. The nuclei of the staminate hair cells in *Tradescantia reflexa*, mounted with absolute alcohol are

similarly preserved with their original spherical shape. They show a feeble but distinct double refraction at every orientation of the nuclei between crossed nicols, but the polarization colours which ought to be visible on insertion of the selenite plate R.I. are not recognizably clear. If, however, the nuclei so treated are brought to a desiccated condition by evaporation, followed by mounting with cedar oil, they assume an elongated form with the long axis parallel to the hair and come to show clearly the negative double refraction colours of interference with respect to their long axis or the length of the staminate hair to which the spindle axis of the mitosis is parallel.¹⁾ From this fact it seems highly probable that even in the spherical nuclei the telophasic orientation of the chromonemata is still maintained partially unaltered, because the contraction of the nuclei by desiccation takes place always more easily in the direction at right angles to the spindle axis or the chromosome orientation at telophase. In some cases, even the spherical nuclei show a nearly uniform extinction as shown in Fig. 2 which indicates a regular orientation of the chromonemata.

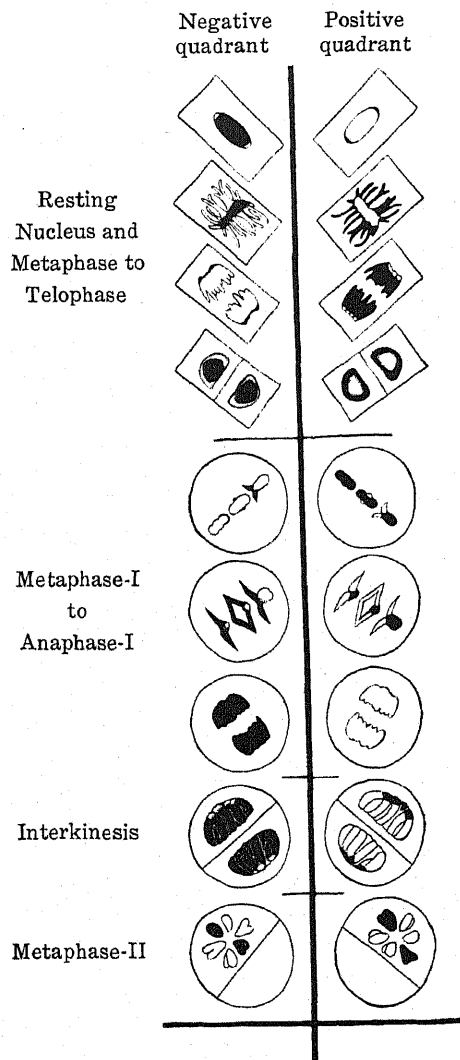
The polar regions of the nuclei show in most cases the opposite polarization colour to that of the main middle portion. This seems due to a curved orientation of the chromosomes at poles as pointed out already in the previous paper (KUWADA and NAKAMURA, 1934), and this may be also regarded as indicating the condition that the telophasic orientation of chromosomes is largely maintained in the resting nucleus, a fact which is very interesting from the view point of the structure of the resting nucleus.

In the root-tip cells of *Vicia faba* it is for the most part difficult to see the optical anisotropy of the nucleus except the peripheral portion of the root-tip, while in the anther wall tissue cells the nuclei show a remarkable double refraction without such a limitation in localization. The reason for the absence or feebleness of the double refraction of the nuclei in the central zone of *Vicia* root-tips remains unknown at present.

Chromosomes in somatic mitosis. In the previous investigation (KUWADA and NAKAMURA, 1934), it has been observed that the chromosomes of the staminate hair cells in *Tradescantia reflexa* are positively doubly refractive with respect to their length. The optical

1) In these nuclei filamentous elements (chromonemata) are found to be strongly birefringent between crossed nicols, transversal dark streaks often appearing across the elements. When the selenite plate R.I. is inserted, we become aware of the fact that the streaks are optically isotropic or reversely coloured to the other portions which are strongly doubly refractive. It seems that the chromonemata are crooked there so that the micellae are found oriented obliquely or perpendicular to the plane of the slide glass.

character is most clearly shown in the anaphase chromosomes. In the wall tissue of the anther in *Fritillaria japonica* and *Tradescantia reflexa*, and in root-tips in *Vicia faba* the double refraction which these chromosomes show is of the positive character as we have reported previously (Fig. 3 a, b and Text-fig. 1). The cases are, however, met with frequently where certain chromosomes present the



Text-fig. 1. Diagrammatic representation showing optical characters of nuclei and chromosomes in different stages in mitosis and meiosis. The black and white indicate the addition colour (violet) and the subtraction colour (yellow) respectively.

reverse polarization colours on insertion of the selenite plate, or show an oblique extinction, or where parts of chromosomes appear to be optically isotropic. These may be explained as due to the optically negative character of the matrix substance of the chromosomes to be mentioned later which may preponderate over the positive optical character of the chromosome, or as due, as pointed out in the previous paper, to the fact that the spiral turns may be fixed during the treatment more obliquely in certain chromosomes than in the others, the relative obliqueness being more pronounced when the direction of coiling is opposite between these chromosomes. The intensity of the double refraction of the chromosomes may also vary in different cells, from greyish white I.O. to nearly dark. This variation seems to be due to the degree of shrinkage to which the chromosomes are brought by dehydration.

In the telophase, the polarization colour pattern which the nucleus shows on insertion of the selenite plate R.I. is the same as that previously reported in the case

of staminate hair cells in *Tradescantia reflexa* (KUWADA and NAKAMURA, 1934), the sign of the birefringence being different in the central and outer regions of the nucleus (Fig. 4 a, b, and Text-fig. 1). This seems, as pointed out in the previous paper, to be due to a complication brought about by the morphological changes which the chromosomes undergo in the transformation towards the interphase.

According to SCHMIDT (1936), in the cleavage mitosis in living sea-urchin eggs the chromosomes are most conspicuously birefringent at the stage where the daughter chromosome groups have separated from each other, and the birefringence becomes then gradually weaker and weaker and finally disappears. He has found that the sign of the birefringence of these chromosomes is positive with respect to the chromosome length. This result from animal somatic mitosis is quite in accordance with the result we obtained in the somatic chromosomes in plants.

Heterotype division. The following results are mainly those obtained by the observation of pollen mother cells in *Fritillaria japonica*. The ordinary acetocarmine preparations show that in *Fritillaria japonica* the chromosomes in the heterotype division are of the doubly coiled spiral structure, as observed by DARLINGTON in some other species of *Fritillaria* (1935).

The chromosomes in metaphase show the negative double refraction with respect to their length in accordance with the result we obtained previously in *Tradescantia reflexa* with the smear method (Figs. 5 a, b; 6 a, b; 7 a, b; 10 a, b; and Text-fig. 1). In polar view, the chromosomes or chromosome arms lying diagonally in the negative quadrant are coloured violet and those in the positive quadrant are yellow on insertion of the selenite plate R.I. (Fig. 8 a, b). In side view also, the same polarization colours that indicate the negative optical character are shown by the chromosomes or chromosome arms, those which are oriented perpendicular to the equatorial plane and those which are parallel to that plane showing corresponding colours according to the diagonal orientations they assume between crossed nicols (Fig. 6 a, b, and Text-fig. 1). In anaphase all the parts of chromosomes are oriented nearly parallel to the spindle axis, and hence, almost all present the same colour, additional or subtractional, which indicates the negative character of their double refraction with respect to their length (Fig. 11 a, b, and Text-fig. 1).

The intensity of the double refraction of the chromosomes is stronger in the pollen mother cells than in the somatic cells. This fact seems to be due to the difference in chromosome structure between the two cells. In the pollen mother cells the chromosome is

of the double coiled structure, and therefore, in its side view, four half-turn lengths of the chromonema spiral are superimposed as a result of coiling, while in the somatic chromosome in which the chromonema forms an ordinary single coiled spiral only two of the half-turn lengths are superimposed. Hence, the double refraction presented by the meiotic chromosomes should be stronger than that shown by the somatic chromosomes.

In metaphase and anaphase the spindle shows a fairly strong positive double refraction with respect to its long axis (Fig. 10 a, b). This result is quite in accord with that obtained previously in the staminate hair cells of *Tradescantia reflexa* (KUWADA and NAKAMURA, 1934). RUNNSTRÖM (1929) has also observed that in fixed pollen mother cells in *Fritillaria imperialis* the spindle shows the positive double refraction. In *Tradescantia reflexa* and *Narcissus tazetta*, however, no such double refraction is shown by the spindle.

In *Fritillaria japonica*, as in *Sagittaria Aginashi* (SHINKE, 1934), and *Trillium erectum* (HUSKINS and SMITH, 1935), the chromosome structure found in the metaphase and anaphase remains fundamentally unaltered in the telophase and interkinesis, and accordingly the polarization colour presented by the telophasic and interkinetic chromosomes on insertion of the selenite plate is the same in each diagonal orientation as that in the anaphase.

The difference in the polarization colour pattern in interkinesis between *Fritillaria* and *Tradescantia* (KUWADA and NAKAMURA, 1934) rests on the fact that while in the former the chromosomes remain not unravelled in this stage, they are unravelled to so considerable an extent in the latter that the major spirals are no longer perceptible and that even the minor spirals undergo a remarkable alteration in the regularity of coiling.

In pollen mother cells in *Narcissus tazetta* too, the heterotype metaphase chromosomes show the negative double refraction with respect to their length (Fig. 9 a, b) as in *Tradescantia* and *Fritillaria*. The acetocarmine preparations show that these chromosomes are of the double coiled spiral structure, a fact which is in accord with the result of observation between crossed nicols.

Here may be added briefly the result of observation of the cell membrane of pollen mother cells which is commonly regarded as built up of a pectic substance. While the pectic membrane is generally known to be optically isotropic, the pollen mother cell membrane shows a negative double refraction in its optical section with respect to the length (Figs. 6, 7, 8, 9, 12, 13, etc.). According to VAN ITERSON a desiccated pectin gel is composed of optically negative

rods,¹⁾ and according to FREY-WYSSLING (1935) the pectic particles themselves are not isotropic but the pectic membrane represents a case of the statistical isotropy. The reason why the pollen mother cell membrane is doubly refractive remains unexplained.

Homotype division. The results to be described below concern only the observation of pollen mother cells in *Fritillaria japonica*. In this plant the chromosomes remain still in the double coiled state in this division as in *Sagittaria Aginashi*. In microtome sections the chromosomes generally exhibit the appearance of a solid rod, their fine internal structure being concealed. They show in the metaphase the negative double refraction in accordance with their double coiled structure (Fig. 13 a, b, and Text-fig. 1), like those in the stages from the heterotypic metaphase to the interkinesis. In *Tradescantia reflexa* (KUWADA and NAKAMURA, 1934), in contrast to the case of *Fritillaria*, the chromosomes in this division are of the single coiled structure as are the somatic chromosomes, and therefore, the sign of double refraction they show is the same as that shown by the somatic chromosomes.

The nucleus and chromosomes treated with boiling water. In opposition to the cases of animal sperm heads and isospore nuclei in *Sphaerozoum*, in both of which the double refraction is abolished by heating (SCHMIDT, 1928, 1932a), it is clearly shown in the growing point of the treated root-tip. The double refraction of the heated nuclei is of the negative character with respect to their long axis (Fig. 16 a, b) as in the case of the material not treated with boiling water.

The heated chromosomes generally swell up in dividing stages so intensely as to give a clear image of two parts, namely an achromatic part with a swollen appearance and a chromatic, filamentous or spiral part which is embedded in the former to form the core (Fig. 14, 15 a). The latter is known to show a positive FEULGEN's nucleal reaction (MILOVIDOV, 1932; SHINKE and SHIGENAGA, 1933), while nothing is yet known about the chemical nature of the former. In our preparations the chromatic part seems not to be doubly refractive in accordance with the result obtained by SCHMIDT mentioned above, but the achromatic, swollen part is decidedly birefringent (Fig. 15 b, c. Comp. Fig. 15a). The double refraction is of the negative character with respect to the chromosome length, in contrast to the case of not heated chromosomes where it is ascribable to the property of the chromatin and is of positive character with respect to their length.

1) Cited from FREY-WYSSLING (1935).

An opinion has been expressed that when treated with boiling water the chromosomes swell up and dissolve gradually from the peripheral part inward, and that in a prolonged treatment only the "Chromosomenegative" remains instead of the chromosome itself (NĚMEC, 1910; MILOVIDOV, 1932). MILOVIDOV is of the opinion that the chromosomes are not composed of two substances such as the chromatin and the matrix substance. According to the writer's results (NAKAMURA, 1934), on the other hand, the chromosomes, even treated with boiling water for an hour, are not completely dissolved away. And the observation with crossed nicols shows that the matrix of the chromosome swells up immediately and is doubly refractive, while the chromatic substance is rapidly fixed by the heat within the matrix and is, perhaps, no longer doubly refractive. The chromosome, therefore, must consist of two substances, the chromatic and the matrical.

The double refraction of the swollen, matrical part of the chromosomes may be due to the existence of a lipid, which has been demonstrated to be one of the component substances of the chromosome (SHINKE and SHIGENAGA, 1933; SHIGENAGA, 1933), but we have at present no direct proof at all. The chemical nature of the matrix remains as yet obscure.

The heated interphasic nuclei in the meristematic region are doubly refractive as mentioned above, and in the periphery of the nuclei in this region a halo-like structure called "Vakuolenkranz" by NĚMEC (1910) is observed with the ordinary microscope. In the elongation zone of the root-tip, on the other hand, the nuclei so treated show no perceptible optical anisotropy, and at the same time the occurrence of the "Vakuolenkranz" is not so remarkable. MILOVIDOV regards the "Vakuolenkranz" as a product from swelling and dissolution of the peripheral portion of the nucleus, but we are at present inclined to the view that it represents the swollen matrix substance distending toward the periphery of the nucleus, and are led to the conclusion that the double refraction shown by the heated nucleus may be largely due to the "Vakuolenkranz" forming substance in the nucleus.

Conclusion

The results obtained in the present investigation are quite in accord with those reported in the previous paper (KUWADA and NAKAMURA, 1934). The optical character or sign of the double refraction of chromosomes is shown to be intimately connected with the structure of the chromosomes or the coiling manner of the chromonema spirals, but the fact that the swollen matrix is doubly re-

fractive suggests that there may be a certain complication in the double refraction presented by the chromosomes.

Similarly to the case of the natrium salt of α -thymusnucleic acid with which SCHMIDT (1934) has carried out a model investigation, the intensity of the double refraction of the nuclei and the chromosomes seems to depend upon the degree of desiccation. The stronger the dehydration that takes place, the more the double refraction becomes pronounced, while the distinctness of the internal structure of the chromosomes or nuclei in the observation with the ordinary microscope proportionally decreases. It has been pointed out by KUWADA and NAKAMURA (1934), on the other hand, that the reliable method of causing the chromosomes or nuclei to be birefringent is to fix the material by certain means before dehydration or desiccation. Desiccation only without any other treatment perhaps causes the fine structure of the chromatin to disintegrate, and accordingly the double refraction is not shown.

While alcohol, according to the results we obtained, seems to be the most suitable agent for demonstration of the double refraction of the nuclei and chromosomes, presumably serving as a fixative and a dehydrating agent at the same time, in living sea-urchin eggs SCHMIDT (1936) has recently confirmed that an addition of alcohol results in cessation of the double refraction of the chromosomes. The question of what internal condition the chromatin is doubly refractive in is the problem of a future investigation.

In conclusion, the writer desires to express his sincerest gratitude to Prof. KUWADA, for his kind guidance and criticism throughout this investigation.

Literature Cited

- Darlington, C. D. (1936): The Internal Mechanics of the Chromosomes. I. Nuclear Cycle in *Fritillaria*. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Vol. 118.
- Frey-Wyssling, A. (1935): Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin.
- Huskins, C. L. and S. G. Smith (1935): Meiotic Chromosome Structure in *Trillium erectum* L. Ann. Bot., Vol. 49.
- Kuwada, Y. and T. Nakamura (1934): Behaviour of Chromonemata in Mitosis. IV, Double refraction of chromosomes in *Tradescantia reflexa*. Cytologia, Vol. 6.
- Milovidov, P. F. (1932): Einfluß von Wasser hoher Temperatur auf den Kern der Pflanzenzellen im Lichte der Nuklealreaktion. (Beitrag zur physikalischen Chemie des Zellkernes). Protoplasma, Bd. 17.
- Nakamura, T. (1934): Structure of Chromosomes Variousely Treated Before Fixation. (Japanese). Bull. Kagoshima Imp. Coll. Agr. & Forest., Dedicated to 25th Anniversary, Vol. 1.
- Němec, B. (1910): Das Problem der Befruchtungsvorgänge. Berlin.
- Patri, H. O. E. (1932): Über die Doppelbrechung der Spermien. Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikrosk. Anat., Bd. 16.
- Runnström, J. (1929): Über die Veränderung der Plasmakolloide bei der Entwicklungserregung des Seeigeleies. II. Protoplasma, Bd. 5.

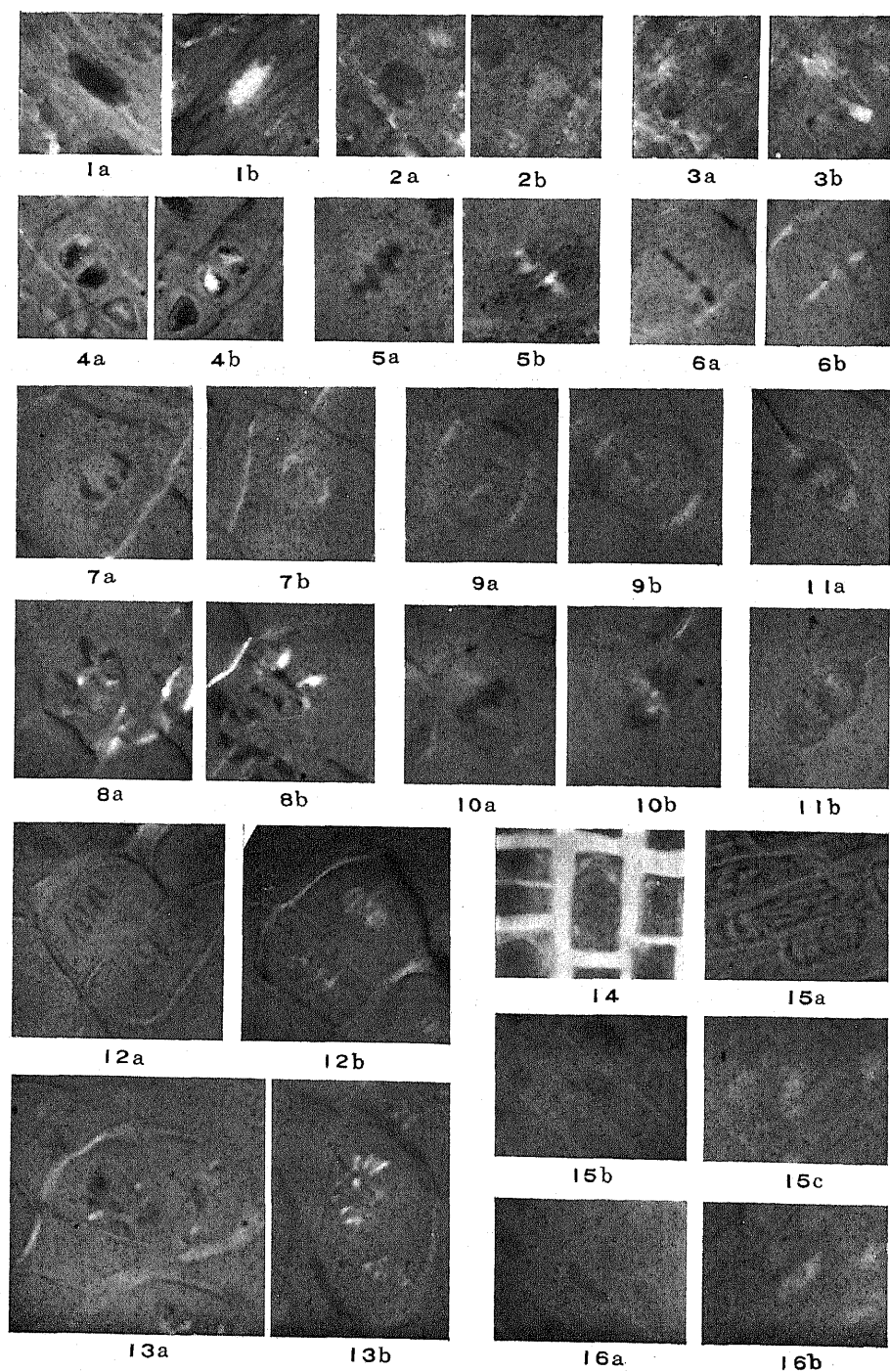
- Schmidt, W. J. (1928): Der submikroskopische Bau des Chromatins. I. Mitteilung: Über die Doppelbrechung des Spermienkopfes. Zool. Jahrb., Abt. f. allgem. Zool. u. Physiol., Bd. 45.
- (1932 a): Der submikroskopische Bau des Chromatins. II. Mitteilung: Über die Doppelbrechung der Isosporenkerne von Sphaerozoen. Archiv f. Protistenkunde, Bd. 77.
- (1932 b): Der submikroskopische Bau des Chromatins. III. Mitteilung: Über die Doppelbrechung der Isosporenkerne von *Thalassicolla*. Archiv f. Protistenkunde, Bd. 78.
- (1932 c): Über Paraffinreste in Zellkernen und anderen Gewebeteilen bei Schnittpreparaten. Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., Bd. 49.
- (1934): Polarizationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben. ABDERHALDEN's Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 10.
- (1936): Doppelbrechung von Kernspindel und Chromosomen im lebenden sich furchenden Ei von *Psammechinus miliaris*, MUELL. Ber. d. Oberhess. Gesellschaft f. Natur- u. Heilkunde zu Gießen, Bd. 17.
- Shigenaga, M. (1933): On the Action of Sodium Glycocholate on Nuclei and Chromosomes. Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ., Ser. B, Vol. 8.
- Shinke, N. (1934): Spiral structure of chromosomes in meiosis in *Sagittaria Aginashii*. Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ., Ser. B, Vol. 9.
- and M. Shigenaga (1933): A Histochemical Study of Plant Nuclei in Rest and Mitosis. Cytologia, Vol. 4.

Explanation of Plate 20

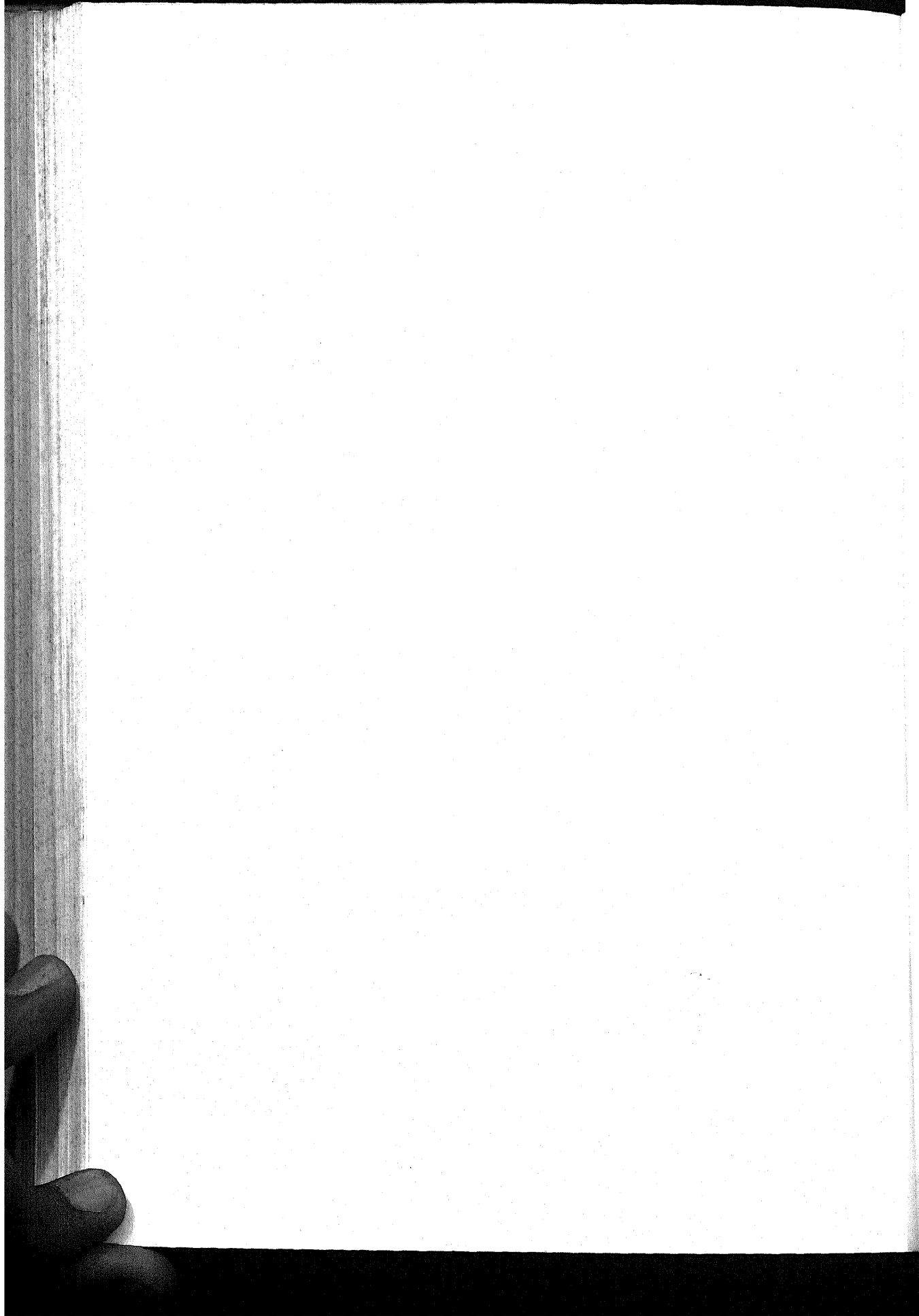
All the figures except Figs. 14 and 15a are photomicrographs taken with ZEISS' achrom. obj. D and comp. oc. K 12, between crossed nicols with the selenite plate R.I. inserted, the photographing being made with the selenite plate shifted from the diagonal position, so as to intensify the contrast in the field by decreasing the brightness of the field. Figs. 14 and 15a are reproductions of the ordinary photomicrographs taken with the same objective and ocular.

In the following explanation of the figures, by (+) is meant that the object is put diagonally in the positive quadrant, and by (−) that it is in the negative. In the photographs the violet colour is dark, and the yellow is light.

- Fig. 1 a, b. Elongated nucleus in anther wall tissue of *Tradescantia reflexa*, showing negative birefringence with respect to the long axis of the nucleus. a (−); b (+).
- Fig. 2 a, b. Spherical nucleus in anther wall tissue of *Tradescantia reflexa*, showing feeble but distinct negative optical character. a (−); b (+).
- Fig. 3 a, b. Chromosomes in late anaphase in root-tip of *Vicia faba*, showing positive double refraction with respect to the spindle axis. a (+); b (−).
- Fig. 4 a, b. Telophasic nuclei in anther wall tissue of *Tradescantia reflexa*, showing different optical characters in the central and peripheral regions of the nuclei.
- Fig. 5 a, b. Chromosomes in heterotypic metaphase in *Fritillaria japonica* in side view, showing the negative double refraction with respect to their length. a (−); b (+).
- Fig. 6 a, b. The same. Note that chromosome arms parallel to the spindle axis show opposite colours to those lying on the equatorial plane. a (−); b (+).
- Fig. 7 a, b. The same, showing negative double refraction of chromosomes with respect to the length. a (−); b (+). Anisotropy of the cell membrane is evident. See also Figs. 6, 8, 9, 12 and 13.
- Fig. 8 a, b. The same in polar view. Note that the colour presented by the chromosomes is different according to the orientation they assume.
- Fig. 9 a, b. Chromosomes in heterotypic metaphase in *Narcissus tazetta*, showing negative double refraction with respect to their length. a (−); b (+).



Nakamura: Double Refraction of the Chromosomes in Paraffin Sections



- Fig. 10 a, b. Chromosomes in early heterotypic anaphase in *F. japonica*, showing double refraction of the chromosomes and the spindle. Note that the latter shows positive birefringence with respect to its long axis. a (—); b (+).
- Fig. 11 a, b. Later stage of the same. a (—); b (+).
- Fig. 12 a, b. Interkinesis in *F. japonica*. Chromosomes show negative double refraction with respect to their length as in metaphase and anaphase. a (—); b (+).
- Fig. 13 a, b. Chromosomes in homotypic metaphase in *F. japonica*, showing negative double refraction of chromosomes as in heterotypic division. Upper spindle is in polar view. Note that chromosomes in different orientation show a different polarization colour.
- Fig. 14. Chromosomes in early anaphase in root-tip of *Vicia faba*, treated with boiling water for 60 seconds, fixed with absolute alcohol, and stained with iron alum haematoxylin. Note that the achromatic part of the chromosome is dilated to a considerable extent and in it the thready chromatic part is embedded.
- Fig. 15 a, b, c. The same. a, photographed without nicols, b and c between crossed nicols. The latter two show negative double refraction of dilated achromatic substance with respect to the chromosome length. b (—); c (+).
- Fig. 16 a, b. Resting nucleus of the same, showing negative double refraction with respect to the long axis. a (—); b (+).
-

Fertility and Compatibility in *Sphaerocarpos*¹⁾

By

Charles E. Allen

University of Wisconsin

The experiments here to be discussed concern the possibility of the production of sporophytic offspring in matings of gametophytic clones of opposite sex variously related, or resembling or differing from each other in varying degrees genetically.

Obviously the production of sporophytes in any such case depends upon the *fertility* of each mated clone, that is, its ability to produce gametes capable of functioning; and upon the *compatibility* of the two clones, that is, the ability of their gametes to unite and to produce viable zygotes.

In case the clones concerned are both fertile and compatible, the appearance or non-appearance of offspring may be influenced also by a variety of conditions internal and external. The healthy or unhealthy condition of either or both clones of course affects the probability of the occurrence of fertilization, or, if fertilization occurs, of the germination of the zygote. The time of year, too—whether because of changing external factors or because of a seasonal adaptation of the plants themselves—plays a part in determining the appearance or non-appearance of sporophytic progeny. Experience shows that, in greenhouse cultures at Madison, the expectation of the appearance of sporophytes is highest in matings made during late winter and spring—approximately from January to March or April. The dates agree fairly closely with those at which sporophytes of *S. Donnellii* and *S. texanus* appear in nature in the southern United States.

Racial Differences in Fertility

One of the oft-noted characteristics of typical races of *Sphaerocarpos* is the early and continuous production of archegonia and antheridia. Leitgeb (10) recorded an observation of the occurrence of sex organs on young gametophytes of a European species 0.1 mm. in diameter. Much the same condition characterizes other species of the genus that have been studied. The very first archegonia and

1) These studies have been made with the aid of grants from the Wisconsin Alumni Research Foundation, and with the assistance at different times of Ineva Reilly, Dorothy Manning, Beatrice Nevins, Margaret Siler, Fred W. Tinney, and Elizabeth Mackay.

antheridia formed are sometimes small and possibly not functional. But in culture sporophytes have appeared in archegonia not more than the fourth or fifth to be formed on a thallus. From this time on and during the life of a clone of either sex, provided it remains healthy, sex organs continue to be formed, and these produce gametes capable of functioning.

These statements, however, do not hold for all races. The majority of the non-typical forms of *S. Donnellii* that have appeared in my cultures show a lower degree of fertility than do typical races, ranging in extreme cases to complete sterility. The lesser fertility may result from the presence of fewer sex organs, from a lower functioning power of the gametes as shown by the number of sporophytes produced, or from both causes. Only those races which show such lower fertility will be mentioned here.

The *vegetative* (2), compared with a typical race, is characterized by a more rapid growth of the thallus, especially of its lobes, and by a smaller proportional number of archegonia or antheridia. Matings of vegetative females with males of various races yield in general fewer sporophytes than would seem to be accounted for by the smaller number of archegonia ready for fertilization at a given time. On the other hand, matings of vegetative males with fertile females of other races often produce considerable numbers of offspring.

The *semisterile* character (3, 13), known only in males, involves a still smaller proportion of sex organs. Often a portion or even the whole of a culture is devoid of antheridia and of the enclosing involucre. When semisterile males are mated with fertile females of other races, sporophytes sometimes appear. But a large proportion of such matings are infertile, and the fertile ones produce but few offspring. Probably the number of fertilizations occurring in such matings is limited by the number of antherozoids available at a given time, rather than by their functional incapacity.

If typical, vegetative, and semisterile races represent a descending series in terms of the number of sex organs produced, the final term of the series might be expected to be embodied in a race that bears no gametangia whatever. Such a race seems to be that provisionally termed *sterile*, also represented in my cultures only by males. In each of two polycladous male clones (33.622 and 33.770) there appeared a small region in which the branches bore no antheridia. A portion of each of these patches was separated, one in November 1933, the other in November 1934; they have been kept in culture since, each giving rise to a clone of considerable size, and each, so far as observation has shown, remaining persistently free of

antheridia. Each has been used in three matings, on the possibility that a rare antheridium might have been overlooked. No sporophytes were produced. On present evidence, then, it appears that completely sterile races have arisen by somatic mutation.

The *cupulate* race (3, 4), known only in the male, has peculiarly shaped involucre and comparatively small antheridia. This race has produced sporophytes in only seven of 39 attempted matings. The successful matings, however, were limited to two seasons; in 1926-27, all three matings, and in 1933-34, four of six matings tried produced offspring. The suggestion is that the antherozoids of this race may be capable of functioning if produced under especially favorable conditions.

Polycladous males (1) are at least approximately as fertile as typical males. Polycladous females, on the contrary, are, so far as extensive experiments indicate, completely sterile. Their lack of fertility is correlated with the absence (save in rare instances) of normal-appearing archegonia. In one line of descent, in which the polycladous character seems to be affected by a modifying factor, female polycladous clones have appeared with a somewhat larger proportion of archegonia—or at least of normally formed archegonial involucre. These clones also in a number of matings have proved sterile.

Another male mutant race that has appeared but once is *dwarf* (4). Gametophytes of this race differ from typical males in the smaller size of all parts, including antheridia. The clone has proved sterile in all the 20 matings in which it has been tested.

Regarding the fertility of heteroploid races the available evidence is still scanty. Most of the diploid intersexes (functional females) which have been tested have proved of relatively low fertility. This has been particularly true of those which inherited the vegetative character (5). On the other hand, the one diploid female (with 2 X's) which has been tested on a large scale in this respect, is as fertile as typical haploid females. Results of some small-scale matings of other heteroploid plants are reported elsewhere (12).

Compatibility and Incompatibility

Intratetrad matings

Conditions known in some other plant phyla led to the expectation that interclonal incompatibility might be found among bryophytes. Specifically, it seemed possible that a particular gametophytic clone of *Sphaerocarpos* might prove sterile in matings, for example, with one or both clones of the opposite sex from the same spore tetrad; or with clones from other tetrads of the same family;

or with clones from different families or of different genetic constitution.

In 1924-25, a large number of clones of *S. Donnellii* were in culture derived from matings of diverse races, all descended from plants originally obtained from Sanford and Miami, Florida. An experiment was planned to test some of the possibilities as to incompatibility just mentioned. For this purpose clones were selected representing offspring of 26 tetrads. These were derived from matings 19, 21, 22, 24, 31, 32, 35, and 36 previously described (4). These matings involved typical, tufted, polycladous, and polycladous tufted races. All four clones from each of 18 tetrads, three clones from each of eight tetrads, were available. Every possible intratetrad mating was made. If all four of a tetrad (2 female, 2 male) were alive, four matings were possible. If only three of a tetrad (2 female, 1 male; or 1 female, 2 male) were at hand, two matings could be made. All the 88 possible intratetrad combinations were tested, the matings being made from January to April, 1925. Sporophytes (in varying numbers) resulted from 74 matings. Most of those matings which failed to yield sporophytes were made in the latter part of the season. In six of the 14 unfruitful matings, the female clone was polycladous; and the failure of results in these cases was to be expected in view of the repeatedly demonstrated sterility of polycladous females. The other eight unsuccessful matings were repeated in 1926; four of them produced sporophytes. In 1927 the remaining four were again repeated; all yielded sporophytes.

Intertetrad matings

In this series of matings the clones used were the same as in the preceding series, with the omission of those from three tetrads. All possible matings were made between clones of 23 pairs of tetrads. As between those of two tetrads, eight matings are possible if all four clones of each tetrad are available; if four of one tetrad and three of the other are at hand, six matings are possible; and either four or five (depending upon the distribution of the sexes) if three from each tetrad are available. In all, 146 matings were made, no polycladous females being used. As before, the unsuccessful matings of 1925 were repeated in 1926 (except two, the males in which had died); and those still unsuccessful were repeated in 1927. In the first year 124 matings produced sporophytes, most of the unsuccessful ones being among those made late in the season. The second year 13, and the third year seven others produced sporophytes. Of the whole number of 146, 144 therefore were ultimately successful.

It may be concluded from this and the preceding series that, so far as these races of *Sphaerocarpos Donnellii* are concerned, there is neither intratetrad, intertetrad, interfamilial, nor interracial incompatibility. Any two clones of opposite sex, neither being *per se* sterile, can produce offspring.

It may be added that the separate- and adherent-spored races of *S. Donnellii*, descended from Sanford and Miami material, are fully intercompatible; and that a number of successful matings have been made between adherent-spored clones obtained through Prof. J. E. Judson from Gainesville, Florida and some of the clones derived from Sanford and Miami. It is still possible that races may be found at other localities which are sufficiently differentiated genetically to be incompatible with some of those already tested; but thus far the evidence is against the occurrence of intraspecific incompatibility.

Interspecific matings

Very numerous interspecific matings, involving crosses of all possible types between *S. Donnellii*, *S. texanus*, and *S. cristatus*, have given negative results. However, females of *S. texanus* from at least two distinct sources have yielded sporophytes in matings with males of *S. Donnellii*. These results have already been briefly referred to (3, 6). A summary follows:

(a) Plants received from Prof. J. T. Buchholz, then at Fayetteville, Arkansas, in April 1923, containing developing sporophytes, were kept in culture until the sporophytes matured, when they were dried. A recent re-examination of the spore tetrads shows that they are typical for *S. texanus* as that species is at present defined. They are conspicuously different from tetrads of *S. Donnellii*. Tetrads sown January 18, 1926, yielded four clones, three female and one male. The male died young. The females were mated at various times from 1927 to 1932 as follows:

Clone 26.2001 was used in six matings with as many male clones of *S. Donnellii*. Three of these matings produced sporophytes.

Clone 26.2002 was used in four matings with as many clones of *S. Donnellii*. Two matings produced sporophytes.

Clone 26.2004 was used in 19 matings with 15 male clones of *S. Donnellii*. Four matings with as many males produced sporophytes.

Spores of sporophytes resulting from seven matings were sown. None germinated.

(b) Plants received from Prof. J. C. McKee, State College, Mississippi, March 1928. Sporophytes in this culture contained tetrads definitely of the *S. texanus* character. Some plants, both male and

female, were separated as the starting-points of clones. Two of the female clones in matings with *S. Donnellii* males produced sporophytes as follows:

Clone 28D9 in one mating yielded three sporophytes. This clone died before other matings could be made. Tetrads from one sporophyte, sown, gave no germinations.

Clone 28D8, used in 15 matings with *S. Donnellii* males of Florida origin from 1928 to 1936, has yielded sporophytes in four matings. Only in one case did sporophytes appear in any considerable number. Spores (in tetrads and dyads) from two of these matings were sown. Of those from one sporophyte, four germinated. One was a spore of a dyad; the plant died while still small. Two spores from one tetrad produced a female and a male clone; one spore from another tetrad produced a female. The female and male clones from spores of the same tetrad proved fertile when mated together; the female was fertile in two of four matings with *S. Donnellii* males, and the male was fertile in two of three matings with *S. Donnellii* females.

That the females from Arkansas and Mississippi above described were really *S. texanus* and that no accidental contamination with, or replacement by, *S. Donnellii* females occurred, is shown by the fact that the spore tetrads in the hybrid sporophytes were similar to *S. texanus* tetrads and conspicuously different from those of *S. Donnellii*, although the *S. Donnellii* influence is possibly manifest to some extent in the markings of the spore walls; this point is still being studied. Hence it is clear that some degree of compatibility exists between certain clones of *S. texanus* and certain clones of *S. Donnellii*. That compatibility even as between these particular clones is relatively slight is suggested by the fact that in 13 of the 14 successful interspecific matings the number of hybrid sporophytes appearing was very small. Knapp (9) has very recently reported a successful cross between *S. texanus* female (diploid) and *S. Donnellii* male.

It is of interest that a few of the spores of one hybrid sporophyte proved capable of germination. The failure of all others sown to germinate is not to be taken as final evidence of their non-germinability, since the proportion of germinations in culture is often low. It is significant also that the two clones of hybrid origin tested have proved intercompatible and compatible also with clones of the paternal species.

One female clone developed from a plant received from Prof. F. McAllister, Austin, Texas, in March 1928, and at the time identified as *S. texanus*, also has proved fertile in matings with *S. Donnellii* males. However, the spore characters of this particular lot of material appear somewhat aberrant, and at present the specific

identification is uncertain. For that reason further discussion is reserved until identification can be more conclusive.

In connection with these results as to interspecific compatibility, it may be noted that *S. Donnellii* and *S. texanus* are unquestionably closely related. The gametophytes, grown under similar conditions, are practically indistinguishable, although those of *S. texanus* are in general somewhat smaller. The sporophytes are likewise similar, except for the characters of the spores which seem to offer the only certain means of discrimination. The two species are closely alike also in their chromosome complements, although Lorbeer (11) finds the X chromosome of *S. texanus* somewhat shorter than that of *S. Donnellii*.

S. cristatus is so different from the other two species mentioned in gametophytic and sporophytic characters and in spore-wall markings that, as Howe (8) noted in the original description, it evidently belongs in a distinct section of the genus. The X chromosome is very different from that in the other species that have been studied (7). Complete incompatibility between this species and either *S. Donnellii* or *S. texanus* is therefore to be expected.

Summary

Genetically distinct races of *Sphaerocarpos Donnellii* differ in fertility, the differences depending upon the proportion of sex organs, upon the functioning power of the gametes, or upon both factors. The differences range from a very high degree of fertility in typical and other races to complete sterility in polycladous females and in sterile and dwarf males.

Matings between clones of *S. Donnellii* derived from spores of the same tetrad, and between clones from spores of distinct tetrads of various races and geographical origin, indicate that, as between any two clones of opposite sex that are *per se* fertile, there is no intratetrad, intertetrad, interfamilial, or interracial incompatibility.

The great majority of attempted interspecific matings, involving *S. Donnellii*, *S. texanus*, and *S. cristatus*, have yielded no progeny. However, sporophytes were produced by matings between a few female clones of *S. texanus* (three from Arkansas, two from Mississippi) and males of *S. Donnellii*.

A few spores from one hybrid sporophyte germinated. Two of the resultant gametophytes (one female, one male) when mated together produced sporophytes; each, mated with *S. Donnellii* clones of opposite sex, produced sporophytes.

Literature

1. Allen, C. E. Gametophytic inheritance in *Sphaerocarpos*. II. The polycladous character. *Genetics* 10: 1-16. 1925.
 2. — The transmission of the vegetative character in *Sphaerocarpos*. *Proc. Amer. Philos. Soc.* 65: 83-89. 1926.
 3. — Inheritance in a hepatic. *Science N. S.* 71: 197-204. 1930.
 4. — Gametophytic inheritance in *Sphaerocarpos*. IV. Further studies of tuftedness and polyclady. *Genetics* 15: 150-188. 1930.
 5. — The occurrence of polyploidy in *Sphaerocarpos*. *Amer. Jour. Bot.* 22: 664-680. 1935.
 6. — The genetics of bryophytes. *Bot. Rev.* 1: 269-291. 1935.
 7. — The chromosomes of *Sphaerocarpos cristatus*. *Bot. Gaz.* 97: 846-853. 1936.
 8. Howe, M. A. The Hepaticae and Anthocerotes of California. *Mem. Torrey Bot. Club* 7: 1-208. 1899.
 9. Knapp, E. Heteroploidie bei *Sphaerocarpus*. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 54: 346-361. 1936.
 10. Leitgeb, H. Untersuchungen über die Lebermoose. IV. Heft. Die Riccieen. Graz, 1879.
 11. Lorbeer, G. Die Zytologie der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung allgemeiner Chromosomenfragen. I. Teil. *Jahrb. Wiss. Bot.* 80: 565-818. 1934.
 12. Mackay, Elizabeth, and C. E. Allen. The offspring of a triploid sporophyte. *Proc. Amer. Philos. Soc.* 76: 781-790. 1936.
 13. Wolfson, A. M. Studies on aberrant forms of *Sphaerocarpos Donnellii*. *Amer. Jour. Bot.* 12: 319-326. 1925.
-

Zur gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Pflanzenblättern

Von

H. Herrmann und L. Singer

Aus dem biologischen Institut der Carlsberg Stiftung, Kopenhagen
(Vorstand Dr. A. FISCHER)

Die Grundlage der gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens (I.Z.R.V.) bildet die Infiltration des Interzellularraumes (I.Z.R.) mit Wasser. Die Differenz zwischen dem Gewicht des infiltrierten und des uninfiltrierten Blattes gibt unmittelbar die Größe des I.Z.R.V. an. Im folgenden soll kurz über Versuche berichtet werden, diese Infiltration durch Injektion des Wassers mit einer Injektionsspritze zu bewerkstelligen. Diese Art der Infiltration erlaubt eine Anwendung der gravimetrischen Bestimmung des I.Z.R.V. auch bei Blättern, die nicht von der Pflanze abgetrennt wurden. Die früher angewandten Infiltrationsmethoden (Zentrifugenmethode¹⁾ Infiltration des evakuierten I.Z.R. unter Druck²⁾) liessen diese Möglichkeit nicht zu. Unsere im folgenden beschriebene Injektionsmethode erfährt in ihrer Anwendbarkeit dadurch eine Einschränkung, daß sie nur bei homöobaren³⁾ und nicht zu dünnen Blättern durchgeführt werden kann.

Vor allem schien es uns wichtig einen Einblick in die Reproduzierbarkeit unserer Bestimmungen des I.Z.R.V. zu erhalten. Wir begannen daher diese Versuchsreihe mit Untersuchungen, die uns über diese Frage orientieren sollten. Dann erst versuchten wir die Bestimmung des I.Z.R.V. unabgetrennter Blätter. Schließlich bemühten wir uns, die Anwendbarkeit der von uns untersuchten Methode bei der Analyse des Wachstums von Pflanzenblättern durch die Bestimmung des I.Z.R.V. verschieden alter Blätter zu demonstrieren.

Methodik: Als Versuchsobjekt verwandeten wir Blätter von Gartenzyklamen. Zur Infiltration wird eine der Hauptblattadern der Blattunterseite, senkrecht zu ihrer Verlaufsrichtung durchstoßen, so daß die Injektionsnadel nach dem Durchstich unter der Blattepidermis der Blattunterseite fortgeführt werden kann. Das Gewebe der Blattader umgreift dabei eng anschließend die Injektionsnadel und verhindert so weitgehend bei der folgenden Injektion ein Ausfließen der Injektionsflüssigkeit aus dem Einstichkanal. Hat man die Nadel einige Millimeter weit knapp unter der Epidermis fortgeführt, so drückt man sanft auf den Spritzenstempel. Dabei sieht man die Injektionsflüssigkeit rasch in den I.Z.R. einfließen. Dort, wo eine Infiltration stattgefunden hat, wird das Blatt in der Aufsicht dunkel in der Durchsicht hell. Bereits wenige Milligramm

injizierten Wassers erzeugen eine scharf umschriebene, von der Umgebung stets eindeutig unterscheidbare Helligkeitsänderung, die sich bei Zyklamen besonders an der Blattunterseite mit freiem Auge ohne jede Schwierigkeit wahrnehmen läßt. Um den gesamten I.Z.R. zu füllen, ist es oft notwendig, zwei bis drei Einstiche an jedem Blatt vorzunehmen.

Bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der gravimetrischen Bestimmung des I.Z.R.V. begnügten wir uns nicht mit der Prüfung der Injektionsmethode, sondern zogen zum Vergleich die Zentrifugenmethode heran.

Zur Kontrolle der Messungsergebnisse der Injektionsmethode stellten wir folgende Versuche an: Es wurde das Gewicht (G_1) eines Blattes ermittelt. Dann wurde der I.Z.R. vollständig infiltriert. In diesem Falle ist die Blattunterfläche vollkommen dunkel und keine lufthaltige Stelle, die sich als heller Fleck scharf abgrenzt zu bemerken. Nach der Infiltration wird das Blatt rasch außen sorgfältig abgetrocknet und sofort gewogen (G_2). Die Differenz $G_2 - G_1$ gibt das Gewicht des injizierten Wassers und damit gleichzeitig das I.Z.R.V. an. Nun liessen wir das Blatt an der Luft liegen, bis es das injizierte Wasser abgegeben hatte und sein Anfangsgewicht wieder erreicht war. Nun wurde die Infiltration wiederholt und das nunmehr ermittelte Gewicht des Infiltrier-Blattes (G_3) mit G_2 verglichen. Die Versuchsergebnisse von Blättern deren I.Z.R.V. wir mit dieser Doppelbestimmung maßen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Blattgewicht G_1 vor Injektion	Blattgewicht G_2 nach erster Injektion	Blattgewicht G_3 nach zweiter Injektion	$G_2 - G_1$	$G_3 - G_1$	Fehler %
719	957	945	238	226	5,2
1148	1428	1442	280	294	4,8
1658	2320	2316	662	658	0,5
1839	2531	2552	692	713	3,2
7799	1037	1055	238	256	7,1
1054	1362	1384	308	330	6,7
385	523	531	143	146	2,1
1150	1465	1484	315	334	5,6
917	1206	1187	289	270	7,0
1111	1518	1511	407	400	1,8
1179	1533	1527	354	348	1,7
3446	4663	4628	1217	1182	1,8
1397	1845	827	448	430	4,0
880	1278	1259	398	379	4,7

Die Gewichte sind in dieser Tabelle in mg angegeben. Da als Infiltrationsflüssigkeit Wasser verwendet wurde, kann man die Milligramm injizierten Wassers gleich setzen dem I.Z.R.V. in cbmm.

Der maximale Fehler bei diesen Doppelbestimmungen beträgt demnach 7,1%.

Der Quotient $\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgewicht}}$ beträgt im Durchschnitt 0,320, d.h. auf eine Einheit des Blattgewichtes entfallen 0,320 Teile I.Z.R.V.

Den gleichen Versuch stellten wir auch mit der Zentrifugenmethode an. Die Infiltration der Blätter erfolgte in einer Zentrifuge bei einer Tourenzahl von 1800 Umdrehungen/Min. In Tabelle 2 sind die Versuchsergebnisse in gleicher Weise wie in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 2

Blattgewicht G_1 vor dem Zentrifug.	Blattgewicht G_2 nach dem 1. Zentrifug.	Blattgewicht G_3 nach dem 2. Zentrifug.	$G_2 - G_1$	$G_3 - G_1$	Fehler %
670	946	958	276	288	4,3
243	545	531	302	288	4,8
1160	1633	1702	523	542	3,5
649	1005	1015	366	366	2,8
756	1071	1086	215	230	6,5
1448	2067	2066	619	618	0,2
1766	2609	2614	843	848	0,5
535	793	795	258	260	0,7
469	715	735	246	266	7,5
381	572	580	191	199	4,0

Bei dieser Methode beträgt der größte Fehler 7,5%. Der Quotient

$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgewicht}}$ beträgt im Durchschnitt 0,5. Der große Unterschied zwischen diesen Quotienten in den beiden Versuchen war auffallend. Bei einer Wiederholung des Versuches mit 12 Blättern, von denen 6 injiziert und 6 zentrifugiert wurden, konnten wir diesen Befund bestätigen. Der Quotient betrug bei den injizierten Blättern 0,412, bei den zentrifugierten Blättern 0,535.

Zur Entscheidung der Frage ob dieser Befund reell und methodisch bedingt ist, untersuchten wir 10 Blätter auf folgende Weise. Das zu untersuchende Blatt wurde gewogen (G_1), in der Zentrifuge vollständig infiltriert und wieder gewogen (G_2). Dann wurde das Blatt bis zur Erreichung des Anfangsgewichtes getrocknet, diesmal mit der Injektionsspritze vollständig infiltriert und abermals gewogen (G_3). Noch einmal auf das Anfangsgewicht gebracht, wieder zentrifugiert und ein letztes Mal gewogen (G_4).

Dabei ergab sich, daß die Werte für das I.Z.R.V. die wir aus der doppelten Infiltration mit der Zentrifuge erhalten hatten, innerhalb der von uns gefundenen Grenze schwankten, während die Infiltration mit der Injektionsspritze zu Werten führte, die um etwa 15% tiefer lagen. Hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit sind also die beiden Methoden gleichwertig. Die Injektionsmethode liefert aber die niedrigeren Absolutwerte. Diese Tatsache scheint auf Grund einer orientierenden mikroskopischen Untersuchung dadurch erklärbar, daß bei der Zentrifugenmethode die Infiltrationsflüssigkeit auch zwischen die dicht nebeneinanderstehenden Zellen des Palisadengewebes gepreßt wird, während diese bei der Injektion nur das eigentliche Schwammparenchym erfüllt.

Diesen Versuchen schlossen wir weitere an, um zu ermitteln ob die gravimetrische Bestimmung des I.Z.R.V. auch an Blättern die nicht von der Pflanze abgetrennt sind durchführbar ist. Die Möglichkeit solcher Messungen schien uns ein wesentlicher Vorteil der Injektionsmethode.

Mit einer Tuberkulinspritze, die mit einer Einteilung von 0,01 ccm ausgestattet ist und bei der man 0,005 ccm ohne weiteres schätzen kann, wurde das betreffende Blatt injiziert und das injizierte Wasservolumen an der Spritze abgelesen. Die aus dem Einstichkanal abfließende Flüssigkeit, die wir durch Auswahl geeigneter Einstichstellen möglichst einzuschränken suchten, wurde in einem gewogenen Wägegläschen aufgefangen und ev. an dem Blatte außen haftende Flüssigkeitströpfchen mit einem ebenfalls gewogenen Löschpapierstückchen abgetrocknet. Die Gewichtszunahme G des Wägegläschens und Löschpapiers wurde bestimmt und von dem gesamten injizierten Flüssigkeitsvolumen V abgezogen. Die Differenz $V - G$ gibt die tatsächlich injizierte Wassermenge und damit gleichzeitig das I.Z.R.V. an. Zur Kontrolle bestimmten wir das I.Z.R.V. bei diesen Versuchsblättern durch direkte Wägung der Gewichtszunahme nach der Injektion, wie wir es oben beschrieben haben. Tabelle 3 gibt die Resultate der direkten und indirekten Wägung an.

Tabelle 3

I.Z.R.V. in cbmm		Fehler in %
direkte Wägung	indirekte Wägung	
100	106	6,0
145	157	8,2
73	67	8,2
316	325	2,9
1537	1620	5,3
637	677	6,2
2107	2203	4,5

Der Fehler beträgt also 8,2% und liegt mithin in Grenzen, die die Methode brauchbar erscheinen lassen. Innerhalb dieser Fehlergrenze ist die Injektionsmethode für die Bestimmung des I.Z.R.V. von Blättern an der Pflanze anwendbar.

Anwendung der Methode. Während der Arbeit an dem rein methodischen Teil dieser Arbeit fiel uns auf, daß ganz kleine, junge, noch nicht einmal ganz entfaltete Blätter ein besonders kleines I.Z.R.V. im Verhältnis zu ihrem Gewicht zeigten. Wir mußten daran denken, ob nicht eine Abhängigkeit zwischen dem I.Z.R.V. und dem Blattgewicht besteht. Wie Tabelle 4 zeigt, konnten wir an drei Zyklamen die am Beginn der Vegetationsperiode untersucht wurden, eine Parallelität zwischen dem Blattgewicht und dem Quotienten

$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgewicht}}$ beobachten.

Tabelle 4

Versuchspflanze 1		Versuchspflanze 2		Versuchspflanze 3	
Blattgew.	$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgew.}}$	Blattgew.	$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgew.}}$	Blattgew.	$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgew.}}$
273	0,154	480	0,376	432	0,318
935	0,331	1090	0,394	560	0,335
2137	0,341	2330	0,458	968	0,379
7435	0,495	2725	0,468	1068	0,414
		4260	0,497	1275	0,439
		8429	0,521	1692	0,445
				2354	0,505

Wir heben absichtlich hervor, daß es sich um Pflanzen handelte, die am Beginn der Vegetationsperiode der Zykamen untersucht wurden. Denn es zeigte sich bald, daß ältere Pflanzen Unregelmäßigkeiten in dieser Gesetzmäßigkeit aufweisen und ganz alte Pflanzen diese vollkommen vermissen lassen. Dagegen bestätigte sich die oben erwähnte Beobachtung, daß die ganz kleinen Blättchen, mit dem für junge Blätter charakteristischen Glanz der Blattoberfläche immer wieder das relativ kleinste I.Z.R.V. aufwiesen. In der folgenden Tabelle 5 bringen wir drei weitere Reihen von Bestimmungen des I.Z.R.V. an Versuchspflanzen, die dieses Verhalten zeigen. Die Versuchspflanze 1 trug drei Blätter von dem erwähnten jugendlichen Typus, die beiden anderen Versuchspflanzen je eines (die jugendlichen Blätter sind immer die ersten in der Tabelle).

Tabelle 5

Versuchspflanze 1		Versuchspflanze 2		Versuchspflanze 3	
Blattgew.	$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgew.}}$	Blattgew.	$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgew.}}$	Blattgew.	$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgew.}}$
138	0,154	88	0,193	113	0,150
203	0,182	270	0,559	198	0,262
223	0,182	910	0,486	236	0,275
270	0,315	1890	0,508	491	0,429
583	0,384	3704	0,440	2470	0,380
640	0,421			4370	0,436
1596	0,340				
1790	0,480				
2599	0,451				
4380	0,450				

Überblicken wir also diese Versuche, so glauben wir folgendes zum Wachstum des Blattes bemerken zu dürfen: Durch die verschiedene Beteiligung der Komponenten am Wachstum eines Blattes kann dieses auf Grund der Bestimmungen des Blattgewichtes und des I.Z.R.V. in zwei Phasen aufgelöst werden. In der ersten Phase sehen wir eine mächtige Entfaltung des I.Z.R., während die Gewichtszunahme relativ in den Hintergrund tritt. Solange sich die Blätter einer Pflanze in diesem Stadium befinden, sieht man eine weitgehende Parallelität zwischen dem Blattgewicht und dem Quotienten

$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgewicht}}$ (Vgl. Tab. 4). In der zweiten Phase geht die Vergrößerung des I.Z.R.V. etwa in gleichem Maße vor sich, wie die Zunahme des Blattgewichtes. In dieser Phase zeigt der Quotient

$\frac{\text{I.Z.R.V.}}{\text{Blattgewicht}}$ keine Abhängigkeit vom Blattgewicht, sondern schwankt nur innerhalb enger Grenzen. Über den Rahmen dieser Arbeit hinaus, scheint die Möglichkeit zu bestehen, auch an Blätter, die sich an der Pflanze befinden, Bestimmungen des I.Z.R.V. mit Hilfe

der Injektionsmethode zu machen. Diese Bestimmungen lassen eine genauere Analyse des Wachstums von Pflanzenblättern und der Beeinflußbarkeit einzelner Komponenten desselben zu.

Wir möchten uns noch erlauben, Herrn Prof. Dr. BOYSEN JENSEN für seine Kritik und Hilfe bei dieser Arbeit unseren verbindlichsten Dank auszusprechen.

Zusammenfassung

1) Es wird die Genauigkeit der gravimetrischen Bestimmung des Interzellularraumvolumens von Zykamenblättern geprüft, wobei zur Infiltration des Interzellularraumes sowohl die Injektion als auch die Zentrifuge verwendet werden.

2) Die Fehlerbreite beider Methoden ist ziemlich gleich und beträgt etwa 7%. Die Zentrifugenmethode gibt die höheren Absolutwerte.

3) An Blättern verschiedenen Alters wird die Beziehung des Quotienten $\frac{\text{Interzellularraumvolumen}}{\text{Blattgewicht}}$ zum Blattgewicht untersucht.

Literatur

- 1) F. Weber, Vitale Blattinfiltration. Protoplasma, Bd. 1. 581, 1927.
- 2) P. Boysen-Jensen, Die Stoffpropuktion der Pflanze, S. 28. Jena 1932.
- 3) F. W. Neger, Spaltöffnungsschluß und künstliche Turgorsteigerung. Ber. d. deutsch. Bot. Ges. 30. 179, 1912.

**Studies in the Cytology of Pteridophyta, XII.
Spermatoteleosis in *Isoetes japonica* Al. Br.**

By

Akira Yuasa

Tokugawa Institute for Biological Research, Tokyo

The spermatogenesis of *Isoetes* was studied, for the first time, by Belajeff in 1885. He stated that both the cytoplasm and nucleus of the spermatid were transformed into a spiral-shape and that the ribbon of the nucleus becomes entirely enveloped by that of the cytoplasm. However, he could not trace the development of the so-called blepharoplast. According to Shibata's description (1902), in *Isoetes japonica* a portion of the cytoplasm of the spermatid becomes thickened and stains deeply with cytoplasm-staining dyes during the course of spermatogenesis and it is this thickened portion of the cytoplasm which subsequently forms the head of the nucleus which has then changed into a spiral-shape. In 1931 Liebig gave an outline of the spermatogenesis of *Isoetes lacustre*, but he did not touch on the problem of the blepharoplast.

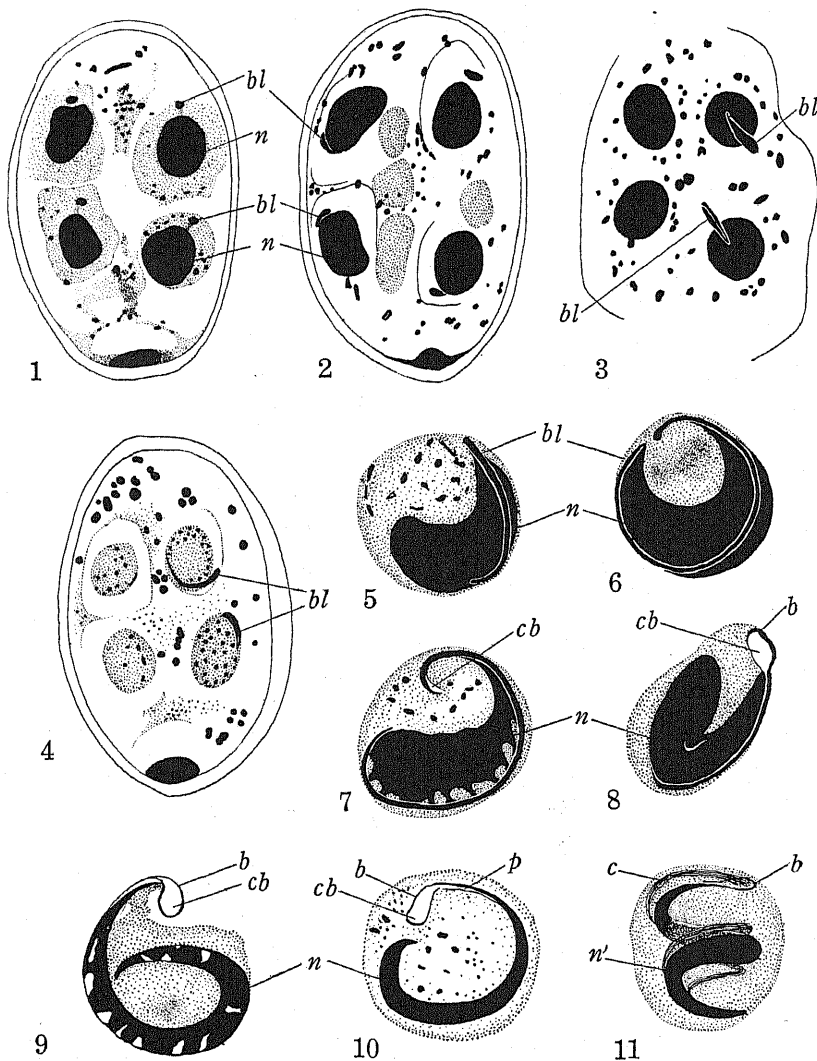
The writer had already studied in 1933 the detailed structure of the spermatozoid of *Isoetes japonica* and confirmed the presence of the border-brim and cilia-bearing portion which bear cilia, at the head of the spermatozoid. The blepharoplast is composed of the cilia-bearing portion together with the plasmic band which runs along the whole length of the nucleus. Such a structure of the blepharoplast in the spermatozoid of *Isoetes japonica* quite corresponds to that of Polypodiaceae.

In the present paper the spermatoteleosis of *Isoetes japonica* was described with special reference to the development of the border-brim.

The microspores of *Isoetes japonica* Al. Br. (Japanese name: *Mizunira*) which grows in the suburbs of Tokyo were taken as the material for the present study. The microspores were fixed in chrom-acetic acid solution, Bonn's modification of Flemming's solution, Benda's solution or picrin-formalin solution. Sections were cut 5 μ in thickness and stained with Heidenhain's iron-alum haematoxylin. The microspores were also stained in vivo with acetocarmine, potassium iodide iodine solution, alcoholic solution of sudan III or 1% aqueous solution of Janus green, etc.

The nucleus of the spermatid stains almost homogeneously and seldom shows a granular structure, having a nucleolus. The cyto-

plasm of the spermatid also shows a homogeneous structure and sometimes contains small granules. In the first stage of the spermatoteleosis, there appears in the cytoplasm of the spermatid a spherical body which stains deeply with haematoxylin (Fig. 1). This is the blepharoplast, but it has not been possible to clarify the details



Figs. 1-11. Spermatoteleosis in *Isoetes japonica* Al. Br. 1. Microspore, showing four spermatids. Appearance of blepharoplast. \times ca. 1100. 2-4. Blepharoplast elongates. \times ca. 1100. 5, 6. Blepharoplast elongates into a thread-like structure along the surface of the nucleus. Nucleus becomes crescent-shaped. \times ca. 2200. 7, 8. Blepharoplast coalesces with the nucleus. Border-brim and cilia-bearing portion differentiate. \times ca. 2200. 9, 10. Nucleus changes into a spiral-form. \times ca. 2200. 11. Almost completed spermatozoid. \times ca. 2200. *bl*, blepharoplast; *c*, cilia; *cb*, cilia-bearing portion; *n*, nucleus of spermatid; *n'*, nucleus of spermatozoid; *p*, plasmic band.

of its origin. The blepharoplast can only be recognized in the spermatid after keen observation, because the microspore is filled with oil drops, mitochondria and other granules and these often make it difficult to observe the inner structure of the spermatid. The blepharoplast shows a negative reaction to Feulgen's nucleal-staining, while the chromatin-substance of the spermatid-nucleus is positive to the staining, so that the blepharoplast does not seem to have a direct relation to the chromatin-substance.

The blepharoplast elongates along the surface of the nucleus as seen in the spermatoteleosis of Eufilicineae. In this stage the blepharoplast appears wedge-shaped (Fig. 3). It gradually elongates into a narrow ribbon-like thread which is attached to the surface of the nucleus (Fig. 4, *bl*). The nucleus becomes crescent-shaped while the blepharoplast runs along the convex side of this crescent (Figs. 5, 6). The crescent-shaped nucleus also elongates beneath the blepharoplast, but the anterior portion does not reach that of the blepharoplast, lying finally at some little distance from the top of the latter. At this stage the anterior portion of the blepharoplast which stretches beyond the nucleus differentiates into the border-brim and cilia-bearing portion (Figs. 7, 8, *b*, *cb*). The nature of the border-brim has already been studied in the previous paper (1936). The other portion of the blepharoplast coalesces with the nucleus, leaving an unstained band (plasmic band) between them along the whole length of the nucleus (Fig. 10, *p*).

The nucleus is stained with Heidenhain's haematoxylin almost homogeneously throughout the course of the spermatoteleosis, but sometimes the granular structure of the nucleus can be observed as shown in Fig. 9. The nucleus takes on a spiral-shape and the border-brim and cilia-bearing portion can be discerned clearly at the anterior portion of the body of the nucleus. The cilia are supposed to appear at this stage though their development has not been traced (Figs. 9, 10).

The spermatozoid in its mature stage is composed of border-brim, cilia-bearing portion, plasmic band and nucleus. The cilia grow from one-side of the surface of the cilia-bearing portion (Fig. 12). The detailed structure of the spermatozoid has already been described in the previous paper (1933).

The granules contained in the cytoplasm of the spermatid are difficult to observe, because they cannot be sufficiently fixed and stained with the various fixatives and staining solutions; and they are also observed only with difficulty in vital state owing to the abundance of oil-drops, mitochondria and starch grains, etc. present in the microspore. At the moment of the extrusion from the antheridium the

spermatozoid coils around the block of cytoplasm of the spermatid which is thrown out or often remains attached to the posterior portion of the spermatozoid. So the granules contained in the cytoplasm of the spermatid can be studied by testing this block of cytoplasm.

No granules showing the starch-reaction can be found in the block of cytoplasm of the spermatid by the method of staining with potassium iodide iodine solution and starch grains are therefore supposed not to exist. The negative evidence of this starch reaction in the residue of the spermatid-cytoplasm has already been described by Dracinski (1932). When staining is carried out with potassium iodide iodine solution some granules which are faintly

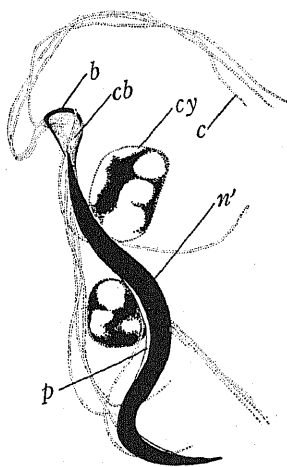
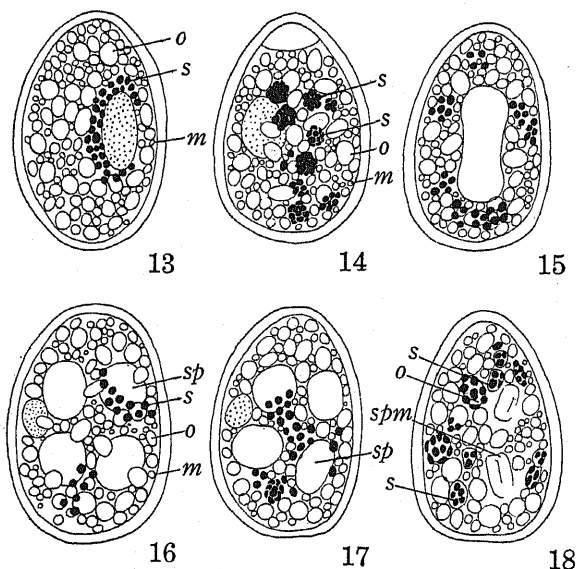


Fig. 12. Spermatozoid of *Isoetes japonica* Al. Br., stained with Heidenhain's iron-alum haematoxylin. \times ca. 3000. *b*, border-brim; *c*, cilium; *cb*, cilia-bearing portion; *cy*, cytoplasm of spermatozoid; *n'*, nucleus; *p*, plasmic band.



Figs. 13-18. Granules, contained in the microspore of *Isoetes japonica* Al. Br. \times ca. 900. 13. Microspore of one-celled stage. 14. Microspore of two-celled stage. 15. Microspore, showing a dividing nucleus. 16, 17. Microspore, containing four spermatids. 18. Microspore, containing four spermatozooids. *m*, mitochondria; *o*, oil drops; *s*, starch grains; *sp*, spermatid-nucleus; *spm*, spermatozoid.

brown can be seen in the block of cytoplasm and are thought to be plastid primordia. With alcoholic solution of sudan III lipid granules which are of varying sizes are seen stained pink. Mitochondria in the block of the cytoplasm are stained faintly violet with 1% aqueous solution of Janus green.

Therefore the cytoplasm of the spermatid seems to contain plastid primordia, mitochondria and lipid granules. Often it contains one or two vacuoles.

When staining is carried out with the potassium iodide iodine solution there can be observed in the microspore small starch grains which stain brownish violet, though these grains are not seen in the spermatid. On being treated with aceto-carmin after having been stained with potassium iodide iodine solution the starch grains show up more clearly. Starch grains exist surrounding the nucleus at the one-nucleated stage of the microspore (Fig. 13, *s*). During the mitosis of the nucleus they retreat from the periphery of the latter and remain in the cytoplasm forming several groups (Fig. 15).

When the microspore enters into the multicelled stage, starch grains are distributed, forming several groups, in all cells except the spermatids (Figs. 16–18).

The starch grains, singly or in groups, are scattered in the cytoplasm (Figs. 13, 16, *s*) or are contained in plastid-hulls (Fig. 18, *s*). The starch grains often come together to form a basket-like structure (Fig. 14, *s*).

Many oil drops of various sizes are seen in the microspore, and are stained pink with alcoholic solution of sudan III (Figs. 13, 14, 16, 18, *o*). Mitochondria are scattered between the oil drops and are stained faintly violet with 1% aqueous solution of Janus green (Figs. 13, 14, 16, *m*).

Summary

The spherical blepharoplast which has appeared in the cytoplasm of the spermatid of *Isoetes japonica* Al. Br. elongates along the surface of the nucleus and coalesces with the latter which has become crescent-shaped. The anterior portion of the nucleus does not reach that of the blepharoplast, lying finally some distance from the top of the latter. In this stage differentiation occurs in the anterior portion of the blepharoplast to give rise to a border-brim and a cilia-bearing portion. Mitochondria, plastid primordia and lipoid granules are contained in the cytoplasm of the spermatid.

The other cells of microspore contains mitochondria, starch grains, plastid primordia and many oil drops.

The writer wishes to express his cordial thanks to Dr. H. Hattori, Director of the Tokugawa Institute for Biological Research, and Dr. Y. Sinotô of Tokyo Imperial University who read through the manuscript and gave much kindly criticism.

The expenses for carrying out this study were partly defrayed out of a grant from Japan Society for the Promotion of Scientific Research to which the writer wishes to express his best thanks.

Literature

- Belajeff, W. 1885. Antheridium und Spermatozoiden der heterosporen Lycopodiaceen. Bot. Zeit., 43: 791-819.
- Dracinschi, M. 1932. Über die reifen Spermatozoiden bei den Pteridophyten (*Selaginella*, *Equisetum*, *Isoetes*, Filicales Leptosporangiateae). Bult. Fac. Șt. Cernăuți, 6: 63-134.
- Liebig, J. 1931. Ergänzungen zur Entwicklungsgeschichte von *Isoetes lacustre* L. Flora, 125: 321-358.
- Shibata, K. 1902. On the development of spermatozoids and fertilization in *Isoetes japonica* (Japanese). Bot. Mag. (Tokyo), 16: 139-140.
- Yuasa, A. 1933. Studies in the Cytology of Pteridophyta, IV. On the spermatozoids of *Selaginella*, *Isoetes* and *Salvinia*. Bot. Mag. (Tokyo), 47: 697-709.
- 1936. Ditto, IX. On the nature of the "border-brim". Bot. Mag. (Tokyo), 50: 151-158.
-

The Determination of Position in Crossing-over. II. The chromosome length-chiasma frequency relation

By

K. Mather

Galton Laboratory, University College, London

Introduction

It has been known for some years that the frequency of crossing-over per unit cytological distance is not constant along the chromosomes of *Drosophila melanogaster* (Dobzhansky 1930, Muller and Painter 1932). Recently the situation in that organism has been analysed in more detail and it has been shown that all the points of crossing-over occur in certain definite regions with characteristic frequency distributions (Mather 1936 b). The positions of these regions of high crossing-over are completely describable in terms of two parameters, viz. the mean cytological distance of formation of the proximal chiasma from the spindle attachment, or centromere, and the mean cytological distance between the positions of the proximal chiasma and the next one. This last distance may for convenience be termed the interference distance, as it is clearly connected with what has been, in the past, called "interference". This distance appears to be constant between the chromosomes. The former distance, that of the proximal chiasma from the centromere, is not constant from chromosome to chromosome and so may be termed the differential distance.

The question arises next as to how universal this state of affairs may be. This demands analyses of the distribution of crossing-over in other organisms to see if they are in agreement with the *Drosophila* system. Unfortunately genetical data cannot be obtained from a sufficiently large sample of organisms for this purpose. The points of crossing-over are, however, detectable cytologically as chiasmata. We can thus extend the analysis of the special distribution of crossing-over to include cases where our knowledge is purely concerned with chiasma formation.

A further difficulty is met when considering the distribution of chiasmata along the chromosomes, as it is known that, at least in some cases, chiasmata change their positions between formation and observation by the process known as terminalisation. Hence without a detailed knowledge of the movements of the chiasmata we cannot assume anything as to their original positions.

There is, however, a class of observations that does throw light on the question, viz. the relation between chiasma frequency and length of chromosome in the bivalents of an organism. This relation is clearly dependent on the regional distribution of the chiasmata and it is the purpose of this paper to consider how far data of this type agree with the *Drosophila* system of position determination.

The Chromosome Length-Chiasma Frequency Relation

Cytological observation shows that organisms having a large range in size between their chromosomes may be grouped into two classes. The first type is that in which the chromosomes, no matter how short, always take part in at least one chiasma [e.g. *Stenobothrus* (Darlington and Dark 1932), *Yucca* (O'Mara 1931)]. The other is the group in which the short chromosomes often fail to form a chiasma [*Fritillaria imperialis* (Darlington 1930), *Lilium* sp. (Mather 1935a)]. In the former type the short bivalents have a chiasma frequency disproportionately high when compared with the long bivalents on the basis of mitotic length. In the second type the chiasma frequency of all the chromosomes appears to be roughly proportional to their length. There are, apparently, no types intermediate between these groups.

All the organisms in which the short chromosomes form a constant, and presumably essential, part of the complement fall into the first group, as, indeed, they must when chiasma formation conditions metaphase pairing and anaphase separation. In the organisms of the second group the short chromosomes are, with a single possible exception, reduplicated segments. This fact alone indicates that, in this second group, pachytene pairing of the short chromosomes will be complicated by choice of partner, and so it is doubtful how far the failure of chiasmata to appear is conditioned by simple failure of chiasma formation between paired chromosomes. The possible exception is eight chromosome rye in which the short eighth bivalent shows no sign of consisting of reduplicated portions of the long chromosomes but does fail to form chiasmata in a number of nuclei (Darlington 1931). The breeding behaviour of rye plants of this type is not fully understood and so the nature of the short extra bivalent is not completely known. In view of these considerations this second class of organisms will not be discussed further until the relatively simple case of the first group has been considered.

The relation between chromosome length and chiasma frequency may be plotted as a graph in which the individual points are supplied by the mean chiasma frequencies of bivalents whose mitotic chromo-

some lengths are known. No data from one organism are sufficiently comprehensive to allow of complete analysis of the chromosome length-chiasma frequency relation. However, it can be seen that the relation naturally falls into two parts, the lower end of the curve, where the chiasma frequency is always 1, or slightly more, no matter how

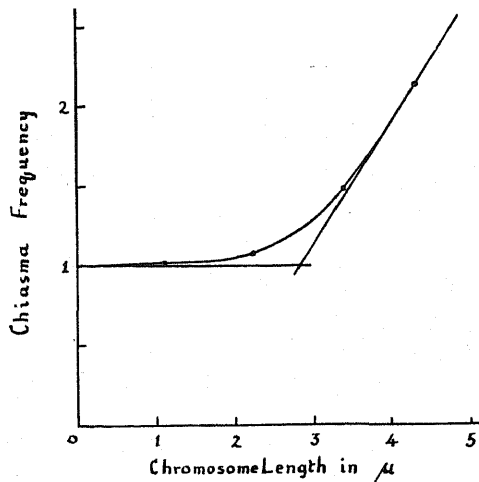


Fig. 1. The chromosome length (abscissa)—chiasma frequency (ordinate) relations of the bivalents of *Locusta migratoria* (unpublished data). Four length classes are distinguished. The straight lines show the two portions into which the curve naturally falls. The curve passes smoothly from one line to other in the region of change, as a result of variation in the parameters determining the positions of the chiasmata.

short the chromosome may be, and the upper portion, where the chiasma frequency increases as the length of the chromosome increases. These two portions are easily recognised in the curve shown in Fig. 1 which is constructed from unpublished data on *Locusta migratoria*. There is presumably no sharp differentiation of the curve into these two portions but a gradual change of direction in the intermediate region or region of change. Such a smoothing out is to be expected as a result of the known variation in the frequency and distribution of chiasma formation (c.f. Mather 1936 b). For the present purpose it is legiti-

mate to neglect this intermediate region as we are concerned solely with the mean behaviour of the chiasmata. The problem at issue is that of the reason for the existence of the two distinct portions of the curve.

The flat part of the curve is concerned with the relations between the chromosome length and the formation of a single chiasma. The sloping upper portion, where the chiasma frequency is rising, concerns the formation of more than one chiasma. The distinction between the two parts lies in the difference of behaviour of chromosomes forming one, or, on the other hand, more than one chiasma. Chiasmata affect one another in formation or determination, as is shown by the universal occurrence of chiasma interference (Haldane 1931). Interference requires a time sequence in chiasma formation, or determination, and this time sequence must also be universal. We

can then recognise the two distinct portions of the curve as dependent on the formation of the first chiasma and on the formation of subsequent chiasmata. It should be noted that the formation of the first chiasma must obey the same rules whether it is to be followed by other chiasmata or not. The rules found to hold true for bivalents on the flat lower part of the curve must also apply to those on the upper sloping portion with the additional complication of subsequent chiasmata.

The lower part of the curve relates the frequency of formation of the first chiasma to chromosome length. The first chiasma, and only this chiasma, is regularly formed in bivalents ranging in length from extremely short to a certain maximum size at which the regular formation of additional chiasmata is possible. Thus a certain length of the chromosomes is "occupied" by the first chiasma. The word occupied is used here to mean "concerned solely with the regular formation of this, and only this, chiasma".

After formation of the first chiasma a second will occur at some mean distance away. This distance is the mean cytological distance of interference since it is determined by the effect of pre-existing chiasma formation on subsequent formation. The third chiasma will bear a similar relation to the second in formation or determination.

The slope of the line to which the upper part of the length-chiasma frequency curve approaches, will be determined solely by this interference distance, since the bivalents in this region of the curve differ only in the mean number of chiasmata over one, that they have formed. The curve will approach the line closely only if the mean cytological distance between the first and second chiasmata is equal or nearly equal to the mean distance between the second and third and so on, and also if these distances are constant between bivalents as the comparison is one between bivalents. If this is not the case the length-chiasma frequency relation in this region will always remain more or less curved. Data exist from a number of organisms by means of which this point may be examined further. In *Allium zebrdanense* (Levan 1935) there are nine bivalents at meiosis and each is recognisable by its length. Eight of them are long enough to fall on the sloping part of the curve as all except IX can form more than one chiasma in at least some nuclei. It will be seen from Table 1 that their mean chiasma frequencies are almost proportional to their lengths. An even better fit is obtained if the best fitting straight line is calculated. For this purpose it is necessary to omit bivalent VIII as this has only one arm, and a nearly terminal centromere; whereas the others, I-VII have two arms, and median centro-

meres. The two arms probably act independently in crossing-over (Mather 1936 b) so preventing comparison of one and two-armed chromosomes. The agreement of bivalents I-VII with the best fitting straight line is very good (Table 1) and there is no *consistent* deviation such as a curve would give. Data from *Allium macranthum* (Levan 1933) and *Hyacinthus orientalis* (Stone and Mather 1932) also fit a straight line quite well, but here the data are not so sound as the chiasma frequencies are not from single bivalents but from groups (Table 2).

Table 1. *Allium zebdanense*—Chiasma Frequencies of Single Bivalents (Levan 1935)

Biv.	Obs.	Expected	
		Prop. to length	Best fitting line
1	2.95	3.02	2.92
2	2.60	2.70	2.66
3	2.60	2.67	2.63
4	2.35	2.34	2.36
5	2.10	1.95	2.04
6	1.60	1.39	1.59
7	1.45	1.33	1.54

Thus there is considerable evidence for the conclusion that the length of interference is constant within and between bivalents. Consequently the upper end of the chromosome length chiasma frequency curve may be considered to approximate closely to a straight line.

The maximum distance occupied by the first chiasma is not of the same magnitude as the interference distance.

This is shown by the fact that the line fitting the upper part of the curve best does not go through the origin. It may pass on either side of this point, i.e. cut the ordinate before the abscissa or *vice versa*. Incomplete curves, i.e. those which do not have two points on the straight upper portion of the curve could give lines cutting the ordinate first but the existence of cases in which the abscissa is first cut conclusively support the above argument. Both kinds of behaviour have been observed (Figs. 1-6 and Table 1).

Table 2

Allium macranthum—Chiasma Frequencies of Length classes (Levan 1933)

Class	Chiasmata per biv.	
	Obs.	Exp.
Long	4.6	4.4
Medium	3.1	3.3
Short	1.4	1.3

Hyacinthus orientalis—Chiasma Frequencies of Length classes (Stone and Mather 1932)

Class	Chiasmata per biv.	
	Obs.	Exp.
Long	4.69	4.80
Medium	2.25	2.06
Short	1.06	1.14

The meaning of this fact is fundamental to the present analysis. If the distance which any chiasma can occupy, or take up, is determined solely by the distance over which, on the average, it prevents the formation of other chiasmata, the maximum distance to be taken by the first chiasma in a bivalent would be the interference distance, as its only action on subsequent chiasma formation would be to prevent the second chiasma or chiasmata forming within a certain region. This is not the case, the first chiasma occupying a certain characteristic maximum length distinct from the interference distance, and so we must conclude that the first chiasma forms relative to some point in the chromosome fixed by conditions other than those of chiasma formation. As to what this point is we are not in a position to judge from these data.

The distance occupied by the first chiasma is then to be interpreted as the mean distance of formation of the first chiasma from this fixed point. It is also worthy of note that the regular time sequence of chiasma formation must be accompanied by a regular spacial sequence as otherwise, where the first chiasma distance is greater than the interference distance, spacially retrogressive chiasma formation would allow of the formation of the second chiasma between the first chiasma and the fixed origin.

This interpretation of the nature and significance of the chromosome length-chiasma frequency curve can be tested further. The essential features of the above conclusions are (a) that the first chiasma forms at a distance from some fixed point in the chromosomes, this distance increasing up to a maximum as the length of the bivalent increases, and (b) that subsequent chiasma formation is dependent on the mean cytological length of interference which is constant between bivalents. These conclusions can be expressed geometrically in terms of the curve shown in Fig. 1. The length of interference determines the slope of the upper part of the curve and may be measured by that slope. The convenient measure is the increase in length of bivalent required to allow of an increase of 1 in chiasma frequency in this region. The characteristic maximum distance of the first chiasma determines the position of this line by fixing the point through which the sloping line will pass where the chiasma frequency is 1. Actually the true curve probably does not go through this intersection but smoothly passes from one line to the other in the region of change (see Fig. 1) as a result of the variation in the cytological distance between chiasmata. This variation can be neglected for the present purpose and the straight sloping line defined by these two parameters of the relation. These parameters are determined by conditions which, if the above analysis is correct, are

independent, or nearly so, of one another. They should then be capable of independent variation, i.e. geometrically speaking, the line should be capable of having its position altered without effect on its slope, and *vice versa* (see Fig. 2).

This is indeed the case, as is shown by White's observations on the effect of temperature on chiasma frequencies in three Orthopteran

insects (White 1934 and Figs. 3-5 of this paper). In two of the three cases (Figs. 3 and 4) the temperature changes resulted in variations which can only be interpreted as changes in position of the line with no change in slope. Whatever changes in slope are to be seen are not consistent and easily accounted for by random sampling. The third case (Fig. 5) is not so convincing but even here the evidence for accompanying change of slope is equally poor. Comparison of White's *Locusta* data with that of Table 1 (Figs. 1 and 3) show that change of slope can also occur in this species. The difference cannot be accounted for by the failure to distinguish more than three length classes in White's observations.

Moffett (1936) gives data on the chiasma frequencies of long

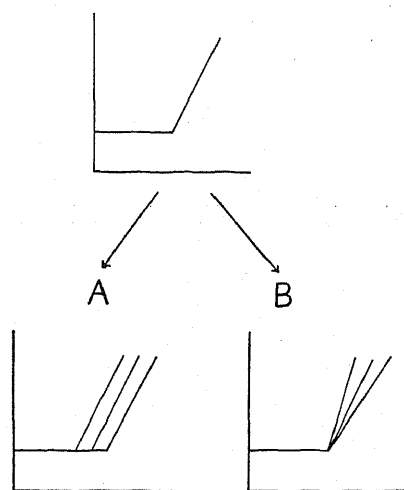
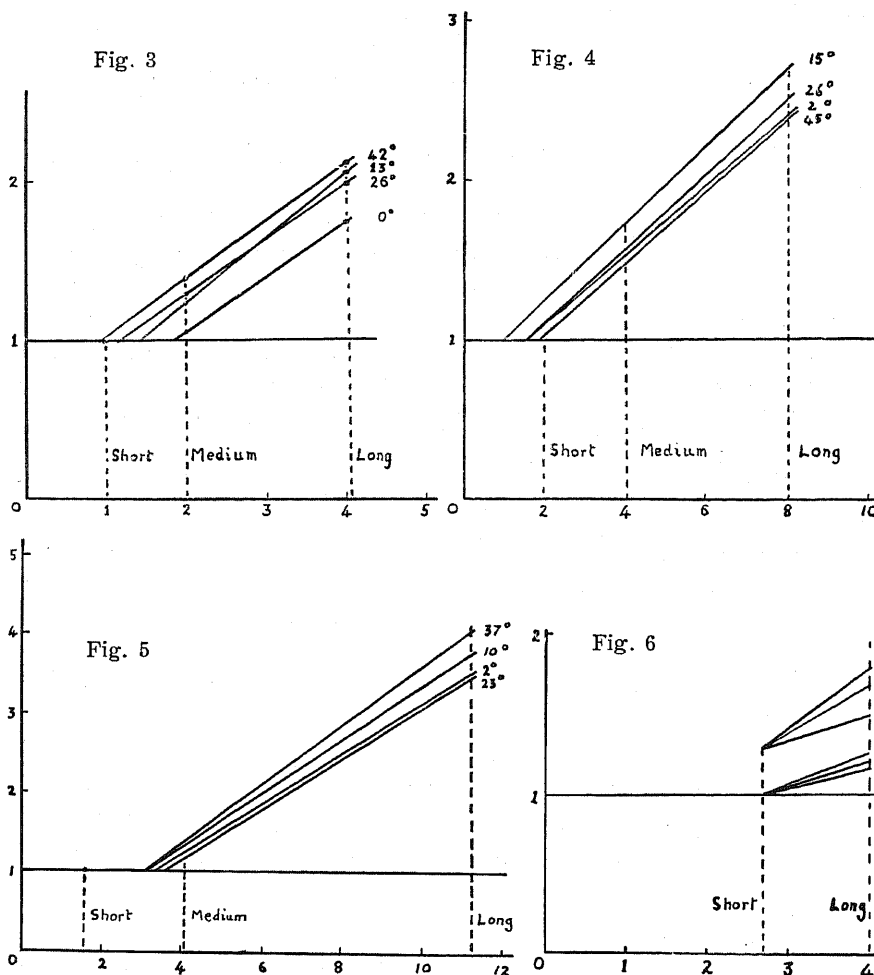


Fig. 2. Diagram to show the effects of varying (a) the distance occupied by the first chiasma, keeping the interference distance constant. (The line changes in position but not slope.) (b) the distance of interference, keeping the first chiasma distance constant. (The line changes slope but not position.)

and short chromosomes in *Culex pipiens*. These vary with the genotype of the individual and it appears that in this case the change is one of slope rather than position. The results are not, however, as clear in meaning as those of White because there are only two sizes of bivalent and each of these is two armed so introducing the complication of two first chiasma distances. This complication does not occur in the two important sets of White's data, those of *Locusta* and *Schistocerca* (Figs. 3 and 4). From the above data there can be no doubt that variations of slope and position are independent, so confirming the interpretation of the curve.

The clear results given by *Locusta* and *Schistocerca* would appear to imply that the region of change is small in these insects. This means, of course, that variation in the position of the chiasmata are small.



Figs. 3, 4 and 5. White's (1934) data on the effect of temperature on chiasma frequency in *Locusta* (3), *Schistocerca* (4) and *Stenobothrus* (5). Three length classes are distinguished in each case. The ordinate gives the chiasma frequency and the abscissa the chromosome length. (See also in the text.)

Fig. 6. Moffett's (1936) data on individual differences in chiasma frequency in *Culex*. Two length classes are distinguished. The ordinate gives the chiasma frequency and the abscissa the chromosome length. (See also in the text.)

This conclusion regarding the region of change is further supported by the *Schistocerca* data. The line through the long and medium chromosome points passes to the left of the short point. There must be a region of the short chromosome in which the first chiasma does not form but which is not as long as the length of interference, and so is not sufficiently long to allow of formation of a second chiasma in the majority of cases. Thus the short chromosome has a disproportionate low chiasma frequency in this case, as

it must be capable of having on any hypothesis of restricted regions of chiasma formation.

It now remains to be seen how far the interpretation of the chromosome length-chiasma frequency relation is in agreement with the *Drosophila* system of restricted regions of chiasma formation.

Discussion

There is a great similarity between the interpretation of the chromosome length-chiasma frequency relation, as developed above, and the system determining the positions of crossing-over in *Drosophila melanogaster*. Such differences as exist are due to the two types of data being complementary in the sense that each gives information on points which cannot be considered from data of the other type. Thus both lines of evidence indicate that the interference distance is constant between chromosomes, although the cytological evidence is more convincing. Both types of data also indicate that the first chiasma takes up a length of chromosome that differs between bivalents. The nature of this inter-bivalent variation is indicated by the genetical data. It is due to crossing-over being determined from the spindle attachment or centromere, and the first, or proximal, chiasma forming at a distance from this point, which proves to be correlated with the length of the chromosome arm. The cytological data only substantiate the conclusion that crossing-over is determined from some fixed point in the chromosome. The cytological evidence shows, however, that the position of the first chiasma can vary without variation in the interference distance, i.e. the independence of the differential and interference distances.

Both types of data show the mean positions of crossing-over to be completely described by these two parameters. The similarity of the results from genetical and cytological analyses shows that there is a system in operation which determines the formation of chiasmata in restricted regions of the chromosomes; and that this mechanism is detectable in all the organisms which have been examined, i.e. it is very probably universal, except in those anomalous cases in which chiasma formation does not form an essential part of meiosis. The unit of behaviour is not the chromosome but the chromosome arm as crossing-over is controlled from the centromere. The first formed chiasma is the proximal one and this forms at a distance, the differential distance, from the centromere. This distance is positively correlated with the length of the chromosome arm. This first chiasma is always formed even in short chromosomes, where the differential distance becomes correspondingly very short. Chiasma formation subsequent to that of the proximal chiasma is dependent

on the position of this first crossing-over, occurring at a given mean cytological distance, the interference distance, from the proximal chiasma. The interference distance is independent of the differential distance and is constant in any organism.

We may now consider the exceptional cases of organisms in which the short chromosomes do not always take part in chiasmata. The clue to the explanation of this situation is to be found in chromosome behaviour in the hybrid between *Triticum monococcum* and *T. dicoccum* (Mather

1935 b). In this hybrid, incomplete metaphase pairing of the chromosomes is conditioned by incomplete pachytene pairing and the relation between length paired at pachytene and frequency of chiasma formation is not linear. In organisms which have reduplicated segments present as short chromosomes, pachytene pairing must be incomplete, as only two chromosomes can pair at any level. Thus even though the short chromosomes when paired always formed a chiasma the incomplete association at early prophase would result in failure of chiasma formation in a proportion of cases. It is not difficult

to imagine the frequency of pachytene pairing being proportional to the length of the chromosome in such cases, and so the observed result would be obtained. In the eight chromosome rye this

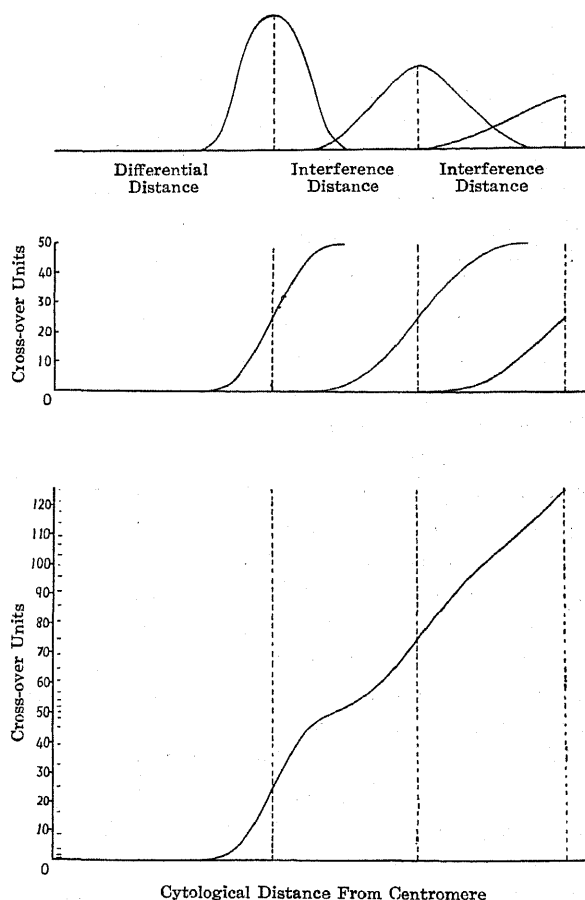


Fig. 7. Diagram to illustrate the relations of cytological and genetical distances between loci in terms of the hypothesis of determination of crossing-over position. (See also in the text.)

argument may not be legitimate as it is not known that the short chromosomes are reduplicated regions. However, the frequency of chiasma formation in this plant is complicated by the occurrence of competition between the bivalents (Darlington 1933, Mather 1936a). This could, itself, lead to the observed failure of pairing and chiasma formation. Thus in all the cases in which the short chromosomes fail to form chiasmata at times, there is an explanation in keeping with the idea that the first chiasma will always form wherever the chromosome is paired, provided that external interference does not come into play.

It is worth digressing somewhat at this point to note that, although the failure of chiasmata to appear in the short extra chromosomes of *Fritillaria imperialis* is due to incomplete pachytene pairing, this does not weaken the evidence supplied by this plant for the chiasma theory of metaphase pairing. Where chiasmata fail, no matter what the cause, metaphase pairing also fails (Darlington 1930).

The hypothesis of position determination in crossing-over may be illustrated diagrammatically as in Fig. 7. The abscissa is, in every case, the cytological chromosome with the centromere as the origin. The top diagram shows the type of frequency distribution curves of chiasma formation about the mean positions of the first, second and third chiasmata. The mean positions are fixed by the two parameters, the differential and interference distances. The variation increases as we pass from the first to the second and then to the third chiasmata as the variation of the first is that of the differential distance only, that of the second this same variation plus that of the interference distance, and that of the third the same as the second plus another interference variation. This follows from the time sequence of chiasma formation. The middle diagram relates the cytological distance between two loci to the genetical distances, due to the first, second, and third chiasmata, between them. These curves are the integrals of those of the top diagram. The bottom diagram relates the cytological and total genetical distances between loci. It is obtained by adding together the curves of the middle diagram. If points on this curve, so chosen that they are separated by a constant cytological distance, are projected onto the ordinate an idea of the crowding and scattering of the genes in genetical maps is obtained. This is done in the bottom diagram and the marks up the ordinate are the result. The similarity of this and the genetical maps of *Drosophila* chromosome arms needs no emphasis. The degree of scatter and crowding is dependent on the variances of the frequency curves of the top diagram.

Discussion of the nature of the factors governing the magnitudes of the interference and differential differences must be reserved for a future publication.

Summary

1. The regional distribution of chiasmata in *Drosophila melanogaster* can be explained on the assumption that they are formed in a regular time sequence commencing at the centromere. The first, or proximal, chiasma forms at a mean distance from the centromere, which is correlated with the length of the chromosome arm. The second chiasma forms at a distance from the first which is probably constant throughout the chromosome complement. This latter distance, the interference distance, is not the same in size as the former, or differential, distance. The chiasma formation therefore depends on two parameters.

2. The chromosome length-chiasma frequency relations in organisms with a large size range, show a curve consisting of two parts. These are the flat lower end, where the chiasma frequency equals one, no matter what the size, and the upper sloping portions where chiasma frequency increases with chromosome length.

3. The distinction between the two parts can be explained as depending on (a) the formation of a first chiasma irrespective of the length of the chromosome, but occupying a distance which is positively correlated with the length of the chromosome arm, and (b) the formation of a second and subsequent chiasmata at a mean distance from the directly previous one dependent on interference and constant throughout the chromosomes.

4. On the basis of this analysis the sloping upper part of the curve is completely described in terms of the two parameters, the slope, depending on the distance between the first and second chiasma, and its position, depending on the mean length of the segment occupied by the first chiasma. These two parameters should be capable of independent variation. Experimental data show this to be the case where genotype or environment are changed (in *Culex* and certain Orthoptera respectively).

5. Since the sloping upper portion of the curve does not cut the origin the first chiasma distance and the interference distance are not equal. Consequently chiasma formation must be determined from some fixed point in the chromosome and must follow a regular spacial sequence.

6. Thus *Drosophila* distribution data and the chromosome length-chiasma frequency data agree in showing the two parameters, the differential and interference distances. This system is funda-

mental and probably universal where chiasma formation occurs. It may, however, be modified by extraneous influences such as incomplete or irregular pachytene pairing, or chiasma competition. Irregular results are then obtained.

References

- Darlington, C. D. 1930. Chromosome studies in *Fritillaria*. III. *Fritillaria imperialis*. *Cytologia* 2: 37-55.
- 1933. The origin and behaviour of chiasmata. VIII. *Secale cereale* ($n = 8$). *Cytologia* 4: 444-52.
- and Dark, S. O. S. 1932. The origin and behaviour of chiasmata. II. *Stenobothrus parallelus*. *Cytologia* 3: 169-85.
- Dobzhansky, T. 1930. Cytological map of the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Biol. Zent.* 50: 671-85.
- Haldane, J. B. S. 1931. The cytological basis of genetical interference. *Cytologia* 3: 54-65.
- Levan, A. 1933. Cytological studies in *Allium*. V. *Allium macranthum*. *Hereditas* 18: 345-59.
- 1935. Cytological studies in *Allium*. VI. *Hereditas* 20: 289-330.
- Mather, K. 1935a. Meiosis in *Lilium*. *Cytologia* 6: 354-80.
- 1935b. Chromosome behaviour in a triploid wheat hybrid. *Zeit. f. Zell. u. mik. Anat.* 23: 119-38.
- 1936a. Competition between bivalents during chiasma formation. *Proc. Roy. Soc. B.* 120: 208-27.
- 1936b. The determination of position in crossing-over I. *J. Genet.* 33: 207-35.
- Moffett, A. A. 1936. The origin and behaviour of chiasmata. XIII. Diploid and tetraploid *Culex pipiens*. *Cytologia* 7: 184-97.
- Muller, H. J. and Painter, T. S. 1932. The differentiation of the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster* into genetically active and inert regions. *Zeit. f. ind. Abs. u. Verer.* 62: 316-63.
- O'Mara, J. 1931. Chromosome pairing in *Yucca flaccida*. *Cytologia* 3: 66-76.
- Stone, L. H. A. and Mather, K. 1932. The origin and behaviour of chiasmata. IV. Diploid and triploid *Hyacinthus*. *Cytologia* 4: 16-25.
- White, M. J. D. 1934. The influence of temperature on chiasma frequency. *J. Genet.* 29: 203-15.

**Triploidie in *Saxifraga stolonifera* Meerb. und *Inula britannica*
subsp. *japonica* Kitam.**

Von
Sakuichi Okabe

Saxifraga stolonifera MEERB. und *Inula britannica* subsp. *japonica* KITAMURA in litt. sind formenreich. Sie wachsen in Japan wild oder sind als Zierpflanze weit verbreitet. Seit einigen Jahren habe ich meine Aufmerksamkeit auf einige Formen der obengenannten Arten gerichtet, weil sie alljährig eine ganze oder doch hohe Samensterilität aufwiesen und sich nur vegetativ vermehrten. Daß die Sterilität der Pflanze manchmal auf der abnormalen Chromosomensetzung, besonders auf der Triploidie, beruht, wurde schon von verschiedenen Forschern erwiesen. Die vorliegende zytologische Untersuchung beweist, daß bei den obengenannten Gewächsen Triploidie vorliegt.

Die Wurzelspitzen wurden mit NAWASCHIN's Gemisch und die Pollen- und Embryosackmutterzellen mit CARNOY's, NAWASCHIN's und BOUIN's Gemisch fixiert. Die Färbung der Paraffinschnitte erfolgte mit HEIDENHAIN's Eisenalaunhämatoxylin oder NEWTON's Gentianaviolett.

Saxifraga stolonifera

Nach SKOVSTED (1934) besitzt *Saxifraga stolonifera* (= *S. sarmentosa* L. fil.) 18 reduzierte Chromosomen und die Reduktionsteilung in der P. M. Z. geht ganz normal vor sich. Die von mir als Material gezogenen Formen zeigten die folgenden Chromosomenzahlen in den Wurzelspitzen, nämlich: *Saxifraga stolonifera* MEERB. 54 (Fig. 1), *S. stolonifera* var. *viridifolia* MAKINO (Fig. 2), und *S. stolonifera* var. *leuconeura* MAKINO 36 (Fig. 3). Aus den obigen Zählungen kann man auf Triploidie bei der ersten Form schließen.

Die Reduktionsteilung in der P. M. Z. der 36 chromosomigen, diploiden Pflanze verläuft, wie schon SKOVSTED berichtet, mit 18 Gemini ganz regelmäßig, somit werden normale Pollenkörner gebildet. Im Gegensatz dazu ist die meiotische Teilung sowie die Pollenbildung bei der triploiden Pflanze sehr unregelmäßig, was Entstehung von Dy-, Tri- und Polyaden, nebst normalen Tetraden zur Folge hat. Fig. 4 und 5 zeigen die Pol- und Seitenansicht der Metaphase der ersten Teilung in den P. M. Z. der triploiden Pflanze. In diesen Abbildungen unterscheiden wir, nebst Bivalenten, einige Uni- und Trivalenten. In der Anaphase weichen die Chromosomen durch

Zufall nach beiden Polen auseinander. Zuweilen zögern aber ein oder mehrere Chromosomen zwischen den Polen; die überzähligen Zwergkerne werden dann ausgebildet. Als Folge der Unregelmäßigkeit der Chromosomenverteilung in der ersten Teilung treten verschiedene Chromosomenzahlen bei der homöotypischen Teilung hervor. Die Größe der fertigen Pollenkörner ist auch sehr verschieden. Eine Hexade, wo zwei große und vier kleine Zellen zu sehen sind, ist in Fig. 6 abgebildet.

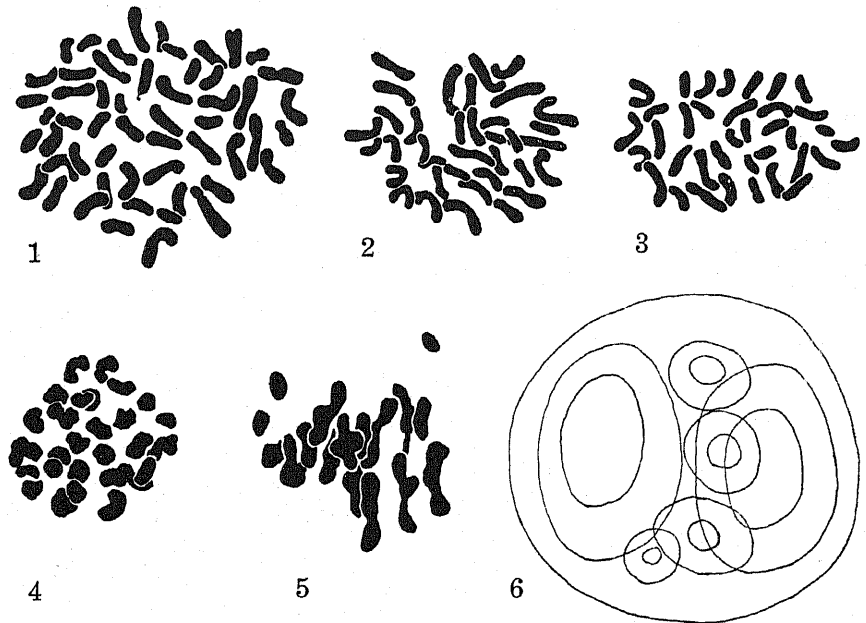


Fig. 1-3. Somatische Kernplatten. 1. *Saxifraga stolonifera*. 2. *S. stolonifera* var. *viridifolia*. 3. *S. stolonifera* var. *leuconeura*. Fig. 4. Polansicht der ersten Metaphase in P.M.Z. von *S. stolonifera*. Fig. 5. Seitenansicht derselben. Fig. 6. Eine Hexade (Essigkarminpräparat). Fig. 1-5. ca. $\times 3500$. Fig. 6. ca. $\times 1800$.

SKOVSTED berichtete in seiner umfangreichen Untersuchung über die Gattung *Saxifraga*, daß bei *S. granulata* und *S. caespitosa* Individuen von verschiedener Herkunft zuweilen verschiedene Chromosomenzahlen besitzen. Zum Beispiel sehen wir bei *S. granulata* eine von 46 bis 60 nahezu ununterbrochene somatische Chromosomenzahlen-Reihe. Es ist auch merkwürdig, daß bei der Reduktionsteilung in ihren P. M. Z. gewöhnlich eine Anzahl von Tri-, Tetra- oder Multivalent zu erscheinen pflegt. Wovon diese verschieden chromosomigen Pflanzen abstammten, blieb dann noch unklar, aber es scheint mir wahrscheinlich, daß sie von einer karyologisch unbeständigen Pflanze durch Vereinigung von Gameten mit verschiedenen Chromosomen entstanden sein dürften.

Saxifraga stolonifera zeigt eine sehr niedrige Fertilität und in einer Kapsel werden nur einige Samen ausgebildet. Wenn sie keimfähig sind, so werden hoffentlich verschieden chromosomige Nachkommen in den nächsten Generationen gefunden werden. Die Fertilität in den diploiden Rassen ist auch ziemlich niedrig.

Inula britannica* subsp. *japonica

Im Sommer 1934 fand ich im Garten des hiesigen Institutes eine ganz sterile Form unbekannter Herkunft von *Inula britannica* subsp. *japonica* KITAM., die in ihrer Wurzelspitze 24 Chromosomen zeigte. Und im vorigen Herbst, in der Umgebung von Sendai, habe ich nun eine fertile Form erworben, die, ausgenommen ihre etwas schmalen Blätter, äußerlich von der obengenannten sterilen Form kaum zu unterscheiden ist. Nach zytologischer Beobachtung hat es sich herausgestellt, daß diese Form mit 16 somatischen Chromosomen eine diploide Pflanze ist. Also sind die 24 Chromosomen der erstgenannten Pflanze als triploid anzunehmen.

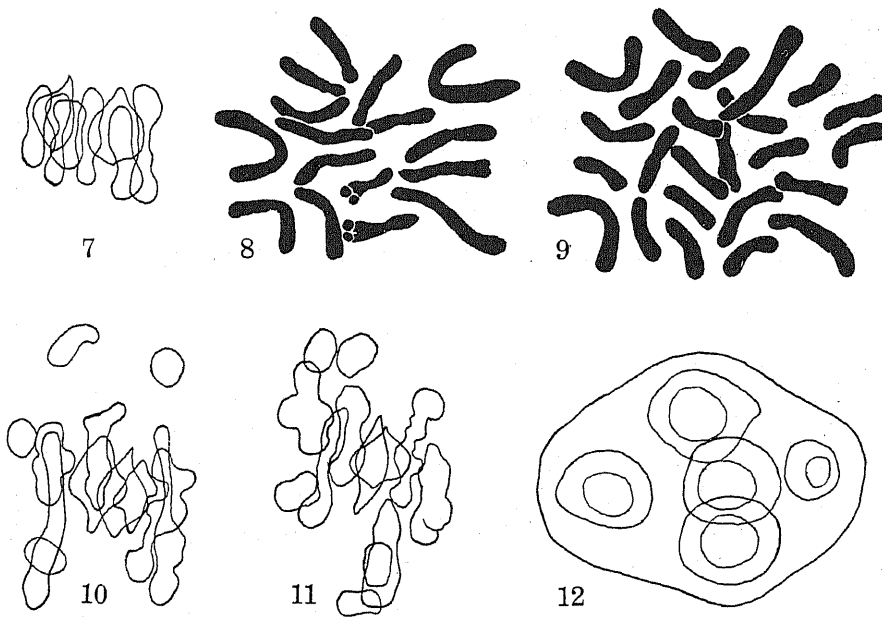


Fig. 7-8. Diploide *Inula britannica* subsp. *japonica*. 7. Seitenansicht der ersten Metaphase in P.M.Z. 8. Somatische Kernplatte. Fig. 9-12. Triploide *Inula britannica* subsp. *japonica*. 9. Somatische Kernplatte. 10-11. Seitenansichten der ersten Metaphasen in P.M.Z., uni-, bi- und trivalente Chromosomen bemerkbar. 12. Eine Pentade (Essigkarminpräparat). Fig. 7-11. ca. $\times 3500$. Fig. 12. ca. $\times 1000$.

Die diploide Pflanze führt die Reduktionsteilung in den P. M. Z. sowie in den E. M. Z. mit 8 Gemini ganz regelmäßig aus, und die

normalen Tetraden werden ausgebildet. Wie in Fig. 10 und Fig. 11 gezeigt worden ist, finden wir aber in der Metaphase der ersten Teilung in den P. M. Z. der triploiden Pflanze wechselnde Zahlen von Uni-, Bi- und Trivalenten. Die Unregelmäßigkeit der Chromosomenverteilung und der Tetradenteilung ist deutlich.

Die Embryosackbildung in den triploiden Pflanzen wurde bis jetzt viel weniger als die Pollenbildung untersucht. Nach ÔSAWA schritt der Teilungsvorgang bei triploiden *Morus* und *Daphne* bis zum Tetradenstadium ganz normal vor, erst in den darauffolgenden Stadien kommen verschiedene Degenerationen zum Vorschein. Unten werde ich die Entwicklung des Embryosackes bei der triploiden *Inula* kurz beschreiben.

Das einzige Archespor, das mit einzelliger Nuzellarschicht umgeben ist, wird direkt zur Embryosackmutterzelle. In der ersten Metaphase der Reduktionsteilung treten nebst Bivalenten einige Uni- und Trivalente hervor, wie in den Pollenmutterzellen. Die zwei aufeinander folgenden Zellteilungen werden im allgemeinen nach der gewohnten Weise ausgeführt. Daraus entstehen die in einer Reihe sich anreihenden vier Megasporen. Wie in Fig. 15 gezeigt ist, erscheinen nur gelegentlich die überzähligen Zwergkerne in einigen Megasporen. Die unterste Zelle von den so gebildeten vier Megasporen vergrößert sich weiter und weiter, indem sie die darüber befindlichen drei übrigen Megasporen und die Nuzellarschicht verdrängt. Die Entwicklung des Embryosackes verläuft, im allgemeinen, bis zum vierkernigen Stadium normal, wie in der diploiden Pflanze (Fig. 14–18). Wenn die weiteren Vorgänge normal vor sich gehen, kommt ein normaler, achtkerniger Embryosack zustande. Die beiden Polkerne verschmelzen sich frühzeitig miteinander (Fig. 19).

In denselben Köpfchen finden wir aber oft eine Anzahl von abnormal gebildeten Embryosäcken. Einige Beispiele davon zeigte ich in den Fig. 20–23. Fig. 22 stellt einen eigenartigen, achtkernigen Embryosack dar. Die Kerne zerstreuen sich im oberen Teile des Embryosackes, ohne die für den Embryosack eigentliche Differenzierung auszuführen. In Fig. 21 liegen dreizehn Kerne ganz regellos im mittleren Teile des Embryosackes. Ein überkerniger Embryosack, der in Fig. 20 vergegenwärtigt ist, ist merkwürdig darin, daß dort Polarität und Differenzierung ziemlich klar erscheinen. In der Mikropylargegend befinden sich vier Zellen, von denen aber keine die für den Eiapparat charakteristische Differenzierung aufweisen. Nur eine Zelle davon hat einen gesunden Kern, während andere drei je einen stark färbbaren, schon degenerierten Kern enthalten. Darunter liegt eine größere Zelle, deren zwei Kerne wahrscheinlich den

Polkernen entsprechen. Im charazalen Teile finden wir fünf antipodale Zellen. Noch ein anderer Fall von Unregelmäßigkeiten ist in Fig. 23 gezeigt worden, wo drei Polkerne miteinander in Berührung

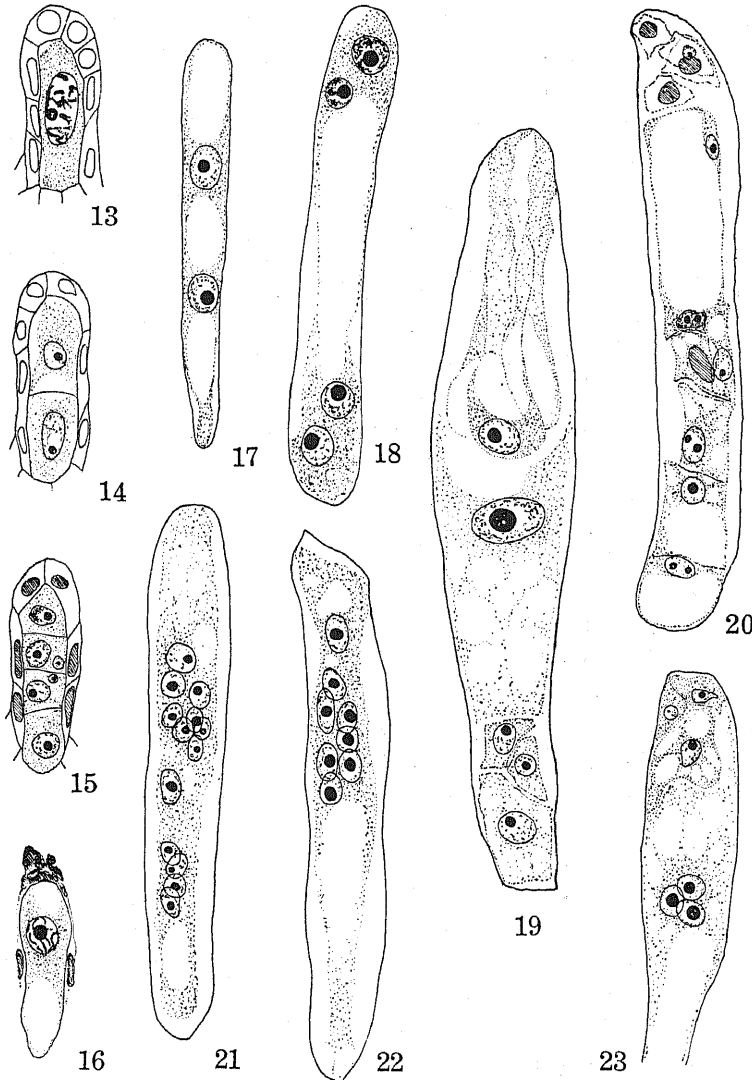


Fig. 13-23. Embryosackbildung in der tripliden Form von *Inula britannica* subsp. *japonica*. 13. E.M.Z. in Diakinesisstadium. 14. Interkinese, wo eine Scheidewand gebildet ist. 15. Vier Megasporen, davon die zwei mittleren je einen Zwergkern enthalten. 16. Einkerniger Embryosack. Der Kern weist Prophase für die erste Kernteilung im Embryosacke auf. 17. Zweikerniger Embryosack. 18. Vierkerniger Embryosack. 19. Fertig gebildeter Embryosack. 20. Abnormal gebildeter, 11 kerniger Embryosack. 21. Abnormaler Embryosack; 13 Kerne liegen im mittleren Teile des Embryosackes. 22. Eigenartiger, 8 kerniger Embryosack. 23. Unregelmäßiger Embryosack, wo drei Polkerne in Berührung treten. ca. $\times 500$.

treten. Zuweilen unterbrechen die Embryosäcke ihre Entwicklung in den vierkernigen oder, wenn auch nur selten, in den noch früheren Stadien, und sie zeigen verschiedene Degenerationsvorgänge.

Ich konnte bis jetzt weder die zum Embryosacke eindringende Pollenschläuche noch die Embryobildung im fertigen Embryosacke finden. Die Sterilität dieser triploiden Pflanze ist also, wie oben erwähnt, sowohl auf die Unregelmäßigkeit in der Pollenbildung als auch auf die in der Embryosackbildung zurückzuführen.

Viele Beispiele der Triploidie wurden, wie schon wohl bekannt, in den Kultur- oder Zierpflanzen von verschiedenen Forschern gefunden, nämlich: *Morus* (ÔSAWA '20), *Canna* (BELLING '21), *Rosa* (TÄCKHOLM '22), *Rubus* (LONGLEY und DARROW '24), *Hyacinthus* (BELLING '25), *Tulipa* (DE MOL '25), *Zea* (RANDOLPH und MCCLINTOCK '26), *Solanum* (LESLEY '26, RYBIN '29, JANAKI-AMMEL '32), *Primula* (IINUMA '26), *Prunus* (DARLINGTON '26, OKABE '27), *Narcissus* (DE MOL '26, NAGAO '29), *Malus* (RYBIN '27, NEBEL '29), *Nicotiana* (AVERY '29, EAST '33), *Daphne* (TAKENAKA '31), *Oryza* (NAKAMORI '32), *Calycanthus* (SAX '33), *Aconitum* (AFIFY '33), *Ananas* (COLLINS '33), *Crocus* (KARASAWA '33), *Musa* (CHEEMAN und LARTER '35), *Chrysanthemum* (SHIMOTOMAI '37).

Es gibt aber noch andere Pflanzengruppen von wildwachsenden triploiden Pflanzen. Zur einer von diesen gehören *Hemerocallis fulva* und *H. disticha* (BELLING '25, TAKENAKA '29), *Iris japonica* (KAZAO '28), *Lycoris radiata* und *squamigera* (NISHIYAMA '28, TAKENAKA '31), *Rumex Acetosa* (ONO und SHIMOTOMAI '28), *Lilium tigrinum* (TAKENAKA und NAGAMATSU '30), *Allium nutans* und *A. carinatum* (LEVAN '31, '33), *Thea sinensis* var. *macrophylla* (KARASAWA '32), *Disporum sessile* (HASEGAWA '33), *Paris quadrifolia* var. *obovata* (HAGA '34), *Convallaria Keiskei* (STOW '34), *Fritillaria camschatcensis* (MATSUURA '35), *Adenophora hakusanensis* (MATSUURA und SUTÔ '35), *Hosta clausa* (YASUI '35), und die diesmal von mir untersuchten *Saxifraga* und *Inula*. Die Samenfertilität dieser Pflanzen ist meistens sehr niedrig. Sie vermehren sich nur ungeschlechtlich, d.h. durch Ausläufer, Knollen, Zwiebeln oder Brutknospen. Bei einigen Fällen, z.B. *Rumex* ist aber die Samenfertilität nicht so niedrig. Sie wurden schon ein sehr günstigen Material für die zytogenetischen Untersuchungen (ONO '35).

Zur zweiten Gruppe der wildwachsenden triploiden Pflanzen gehören eine Reihe der apomiktischen Arten in der Gattung *Taraxacum*, *Erigeron*, *Ixeris*, *Hieracium*, *Chondrilla*, *Antennaria*, *Eupatorium*, *Sorbus*, und *Poa*.

Die Konjugation der Chromosomen in der Reduktionsteilung der triploiden Pflanze ist von großer Bedeutung. Wenn die Pflanze mit

drei homologen Genomen aufgebaut ist, so kann man gewöhnlich eine Anzahl von Trivalenten in der ersten Metaphase der Reduktionsteilung erkennen. Bei den meisten Fällen der obengenannten triploiden Pflanzen wurde das Auftreten von Trivalenten nachgewiesen. Also ist es anzunehmen, daß die große Mehrzahl der triploiden Pflanzen autotriploid ist.

Zusammenfassung

1. Die folgenden somatischen Chromosomenzahlen wurden nachgewiesen.

<i>Saxifraga stolonifera</i>	54	(Triploid).
<i>S. stolonifera</i> var. <i>viridifolia</i>	36	(Diploid).
<i>S. stolonifera</i> var. <i>leuconeura</i>	36	(Diploid).
<i>Inula britannica</i> subsp. <i>japonica</i> eine Form.	16	(Diploid).
eine andere Form	24	(Triploid).

2. Die Reduktionsteilung in den Pollenmutterzellen dieser diploiden Pflanzen geht mit reduzierten Chromosomenzahlen normal vor sich.

3. In der ersten Metaphase der Reduktionsteilung der triploiden Pflanzen treten einige Trivalenten auf, was auf die Autotriploidie dieser Formen zurückzuführen ist.

4. Die Embryosackbildung in der triploiden *Inula* wurde untersucht. Verschiedene Abnormalitäten z.B. Degeneration des Embryosackes, Verlust von Polarität und Differenzierung wurden nachgewiesen.

Zum Schluß möchte ich Herrn Prof. Dr. M. TAHARA meinen herzlichen Dank für seine freundliche Unterstützung aussprechen.

Biologisches Institut der Kaiserlichen
Tōhoku Universität, Sendai.

Literatur

- Belling, J. 1925. Chromosomes of *Canna* and of *Hemerocallis*. Journ. Hered. 16.
Haga, T. 1934. On the karyotypes and their gametes of *Paris quadrifolia* L. var. *obovata* REGEL et TIL. (A preliminary note). Bot. Mag. (Tokyo) 48.
Hasegawa, N. 1933. Chromosome studies in diploid and triploid forms of *Disporum sessile*. Jap. Journ. Gen. 9.
Karasawa, K. 1932. On triploid *Thea*. Bot. Mag. (Tokyo) 46.
Kazao, N. 1928. Cytological studies on *Iris*. Bot. Mag. (Tokyo) 42.
Levan, A. 1931. Cytological studies in *Allium*. Hereditas 15.
— 1933. Cytological studies in *Allium* III. *Allium carinatum* and *Allium oleraceum*. Hereditas 18.
Matsuura, H. 1935. On karyo-ecotypes of *Fritillaria camschatcensis* (L.) KERGAWLER. Journ. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. V. 3.
— and Sutō, T. 1935. Contributions to idiogram study in phanerogamous plants I. Journ. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. V. 5.

- Nishiyama, I. 1928. Reduction division in *Lycoris*. Bot. Mag. (Tokyo) 42.
- Ono, T. 1935. Chromosomen und Sexualität von *Rumex Acetosa*. Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ. 4th Ser. Biol. 10.
- and Shimotomai, N. 1928. Triploid and tetraploid intersex of *Rumex Acetosa* L. Bot. Mag. (Tokyo) 42.
- Ôsawa, I. 1913. On the development of the pollen-grain and embryo-sac of *Daphne*, with special reference to the sterility of *Daphne odora*. Journ. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo 4.
- 1920. Cytological and experimental studies in *Morus* with special reference to triploid mutants. Bull. Imp. Seric. Exp. Stat. Japan 1. (Japanisch).
- Skovsted, A. 1934. Cytological studies in the tribe Saxifrageae. Dansk Bot. Arkiv 8.
- Stow, I. 1934. On the triploid japanese lily of the valley found in the wild of Hokkaido. Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. 13.
- Takenaka, Y. 1929. Karyological studies in *Hemerocallis*. Cytologia 1.
- 1931. Further reports of the cytological investigations on the sterile plants. Journ. Chosen Nat. Hist. Soc. 12.
- and Nagamatsu, T. 1930. On the chromosomes of *Lilium tigrinum*, KER-GAWL. Bot. Mag. (Tokyo) 44.
- Yasui, K. 1935. Cytological studies in diploid and triploid *Hosta*. Cytologia 6.
-

Intergeneric Hybridisation in Cichorieae, III. Fertility and chromosome variations in F_1 and F_2 progeny of *Paraixeris denticulata* and *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium*¹⁾

By

Humihiko Ono

Division of Genetics, Bot. Inst., Tokyo Imp. Univ.

Some results obtained from genetical and cytological studies on F_1 hybrids of *Paraixeris denticulata* and *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* have been given in the second paper of this series (Ono and Satô, 1935), and these showed that some of the artificially synthesized hybrids were entirely similar morphologically and cytologically to *Paraixeris denticulatoplatyphylla* which had been described by T. Makino (1917) as a species and considered by him as having probably arisen from natural hybridisation between *Paraixeris denticulata* and *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium*. The F_1 hybrids were quite normal in meiotic behaviour and produced healthy pollen grains.

The aim of the present work was to observe the fertility of the F_1 hybrids, and the external morphology and chromosome constitutions of F_2 progeny which have resulted from the regular segregation of all the heteromorphic pairs of chromosomes of the F_1 hybrids.

Material and method

Some F_1 achenes of *Paraixeris denticulata* \times *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* were obtained in the fall of 1933, and sown in the spring of the next year. Eleven of the F_1 plants flowered in the fall of 1935 and were used for the present investigation. These plants were kept isolated in a wooden frame and left there for open-pollination. Achenes thus obtained were sown in the spring of 1936, in an earthenware germination tester, and the seedlings were transplanted in 6 inch pots. The root-tips of these plants, after about two months growth, were fixed with Navashin's fluid. In dehydrating and imbedding, Randolph's schedule (1935) was adopted with fairly good results. Paraffin sections were made in 10μ thickness, and stained by Newton's gentian-violet iodine method. Drawings were made by the aid of camera lucida at a magnification of 90/20.

1) Contributions from the Divisions of Plant-Morphology and of Genetics, Botanical Institute, Faculty of Science, Tokyo Imperial University, No. 182.

Observations

Fertility of the F₁ hybrids

It has been previously proved that *Paraixeris denticulata* is nearly completely self-sterile and the hybrids of this species and *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* are partially self-sterile (Ono and Satô, 1935). In 1935 the eleven F₁ plants were placed in one

Table 1. Number of achenes obtained from 11 F₁ hybrids

9 F ₁ plants (PdCl)	3	4	6	7a	7b	7c	9	10	12
F ₂ achenes obtained	0	5	7	11	5	0	1	1	6

wooden frame and free pollination thus allowed to set F₂ achenes. The fertility of these F₁ hybrids was proved

to be quite low, as far as the present observation is concerned. The number of achenes thus obtained are shown in Table 1. The causes of such a low fertility will be considered later on (p. 537).

Germination of the F₂ achenes

In the November of 1935, a part of the F₂ achenes obtained in the same year were sown in the germination tester, but no seedlings were produced. It was not certain whether the achenes had no germinating power from the beginning, until by analogy with the fact that the achenes of *Paraixeris denticulata* have a resting stage of about 5-6 months

Table 2. Number of F₂ seedlings

4 F ₁ plants (PdCl)	4	6	7a	12
Achenes sown	5	7	11	6
F ₂ seedlings obtained	3	6	2	4

the supposition occurred that the hybrid achenes might have also about the same dormant period as the parent. As was expected, the rest of the 1935 F₂ achenes sown in June, 1936, in the germination tester showed a power of germination and the number of the seedlings thus obtained is shown in Table 2.

Morphology of the F₂ plants

Although the F₂ plants are not yet matured, there is a considerable variation in their external morphology even in the early stage of development. Some of them (PdCl 4-1, 6-1, 6-2, 6-4, 6-6, 7a-2) are similar to *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium*, and the others to the F₁ hybrids. But it is to be noted that no individuals similar to *Paraixeris denticulata* are observed. These young F₂ plants are seen in Fig. 1.

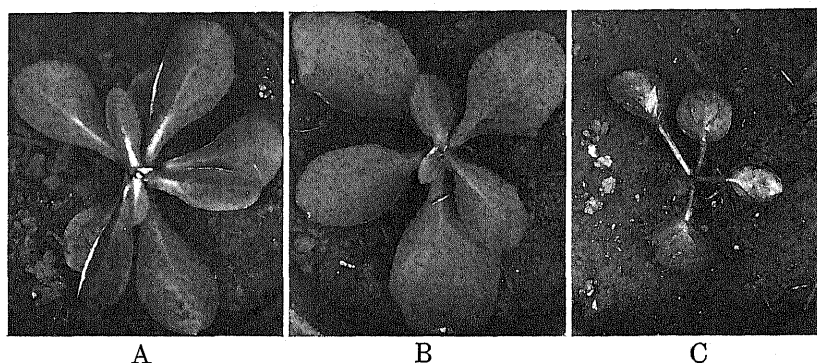


Fig. 1. External morphology of F_2 plants: A, an individual similar to *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium*. B, C, intermediate individuals, the latter more resembling *Paraixeris denticulata*. $\times 1/2$.

Somatic chromosomes of the F_2 plants

To analyze the chromosomal constitutions of the F_2 plants the somatic chromosomes of the following 10 plants were examined: PdCl 4-2, 6-1, 6-3, 6-4, 7a-1, 7a-2, 12-1, 12-2, 12-3, and 12-4.

Table 3. Chromosome constitutions of F_2 plants

10 F_2 plants (PdCl)		4-2	6-1	6-3	6-4	7a-1	7a-2	12-1	12-2	12-3	12-4
Number of chromosomes	<i>Crepidiastrum lanceolatum</i> var. <i>latifolium</i>	6	8	5	9	5	8	4	5	3	3
	<i>Paraixeris denticulata</i>	4	2	5	1	5	2	6	5	7	7

The satellite chromosome from *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* and the smallest chromosome from *Paraixeris denticulata* could easily be distinguished in these hybrids. But the discrimination of other chromosomes was only possible after a careful examination of many plates had been made. The chromosome constitutions of the examined plants showed a variation, as is seen in Table 3 and Fig. 2.

Discussion

As previously described (Ono and Satô, 1935), the F_1 hybrids of *Paraixeris denticulata* and *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* were proved to be quite regular in their meiotic behaviour and consequently their pollen grains were all normal, though their parents show quite a conspicuous difference in their external morphology with some contrasts in their chromosome size and behaviour. It may be reasonably concluded, therefore, that the mode of meiosis has no causal relation to the low fertility of the F_1 hybrids, though the problem of pairing of chromosomes and their homology must be

taken into consideration in this respect. It is probably correct though premature to surmise, that the low fertility of the F_1 hybrids in the present case may be attributed to some physiological conditions, such as: 1) the fact that when the plants were placed isolated

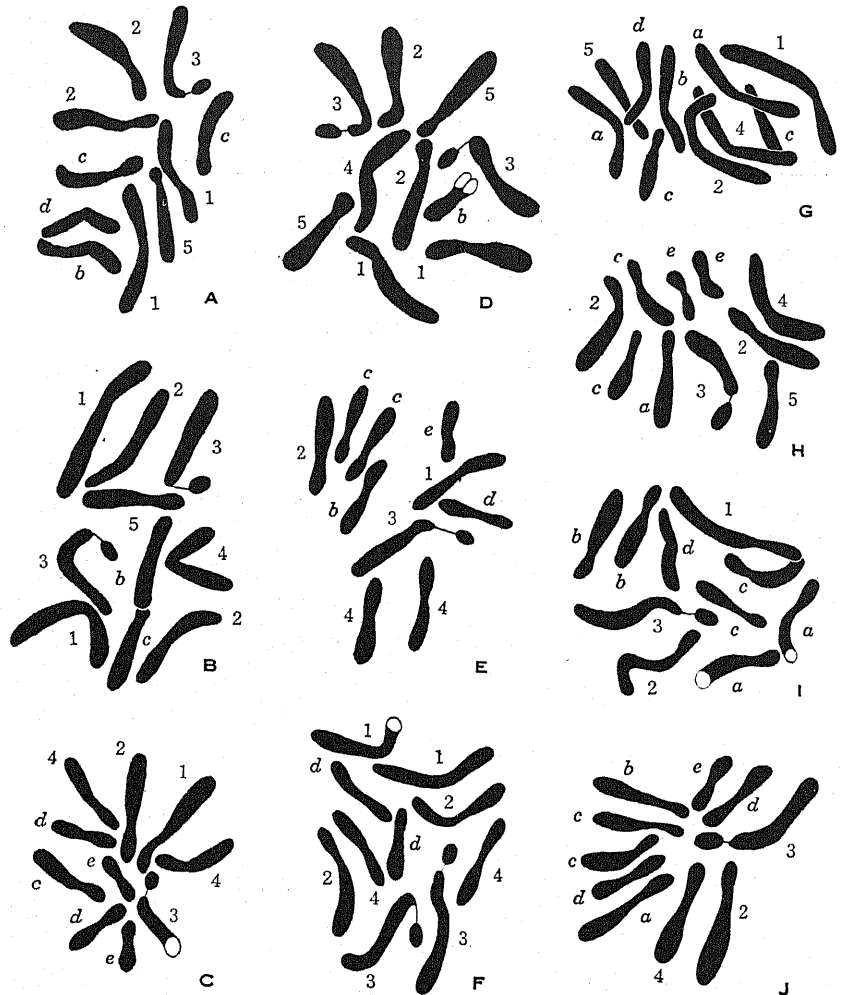


Fig. 2. Chromosome morphology of F_2 plants. A, PdCl 4-2. B, 6-1. C, 6-3. D, 6-4. E, 7a-1. F, 7a-2. G, 12-1. H, 12-2. I, 12-3. J, 12-4. Chromosomes designated by 1, 2, 3, 4 or 5 are derived from *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* and those designated by a, b, c, d or e are from *Paraixeris denticulata*. $\times 3150$.

in the frame, without any artificial pollination, there may be only a small chance of cross-pollination, and 2) the genic conditions. As already mentioned above, no individuals entirely resembling *Paraixeris denticulata* were found, although there were individuals

similar either to *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* or to the F_1 hybrids. This fact seems to show that in these cultural conditions self-fertilization had chiefly taken place and that there are genes in certain chromosomes from *Paraixeris denticulata* to prevent self-fertilization (cf. East and Mangelsdorf, 1925).

The investigation of somatic chromosomes of the F_2 plants showed that the random separation of the heteromorphic pairs in the first meiotic division of the F_1 hybrids may have taken place and that all combinations of chromosomes of the two parental sources may have been produced. The correlations between the external morphology of the F_2 plants examined and their chromosomal constitutions were also recognized. The full description of this will be left until after the further investigations have been carried out.

Summary

Eleven hybrids of *Paraixeris denticulata* and *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* were kept isolated in one wooden frame to allow pollination to take place freely. In this case their fertility was very low which may be due to the physiological conditions, especially to the genic one causing the self-sterility of the female parent.

There is a considerable diversity in both the external morphology of the F_2 plants and their chromosome constitutions. The correlation between the external morphology and chromosomal constitutions in the F_2 plants examined was observed.

The writer wishes to acknowledge his sincerest thanks to Dr. Y. Sinotô for his valuable criticism and encouragement during the course of this investigation.

Literature

- East, E. M. and Mangelsdorf, A. J. 1925. A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 9: 166-171.
- Makino, T. 1917. A contribution to the knowledge of the flora of Japan. *Jour. Jap. Bot.*, 1: 11-14.
- Ono, H. kaj Satô, D. 1935. Intergenra hibridigo en Cichorieae, II. Hibridoj de *Crepidiastrum lanceolatum* var. *latifolium* kaj *Paraixeris denticulata*. *Jap. Jour. Genet.*, 11: 169-178.
- Randolph, L. F. 1935. A new fixing fluid and revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Techn.*, 10: 95-96.

The Significance of Experimental Parthenogenesis for the Cell-biology of To-day

By

Ernest Everett Just

Department of Zoology, Howard University, Washington, D. C.

I

In the last seventy years many changes have taken place in biology and especially in that branch of it which this journal covers. The scope of *Cytologia*, embracing all aspects of cell-study, indicates a point of view which surveys a larger domain than that encompassed by those who envisage cytology as restricted to the structure and behavior of only one component of the cell. We seem now to have reached a point where we turn again from particle-conceptions, as the gene-theory for example, of living matter,—as earlier we abandoned the theory of the biogen-molecule,—to the older conception of the cell as the unit of structure and of function. This return is no retrogression; it indicates rather the need for a synthesis of the vast number of particularistic studies and for a biological philosophy which recognizes the organization of living matter by which the living thing is set apart from the non-living. The like shifting in conceptions to be noted in physics of to-day implies that all natural science approaches a new day. We thus are impelled to mark the way along which we have come and to reckon the place where we now stand.

In these seventy years of cytological study falls a period in which experimental parthenogenesis flourished like a green bay tree. Indeed, it seemed for a time to promise to rise to the proportions of a biological discipline. But it passed, having bloomed a little hour or two. In this short time it had taken to itself pretensions which proved to be vain, had gone too far in a mechanistic (but in no sense physical) direction and had given rise to unfounded hopes that the grand problem of life had been solved. That it now has no longer great vogue, is owing not so much to the biologists' craving for new modes as to the conceptions derived from it by its foremost student—conceptions which in the light of our knowledge of biological processes generally, of the organization that characterizes living matter, and of the relation of a living cell to its environment, we had to abandon. Nevertheless, the work on experimental parthenogenesis

had hidden worth. I propose to show in the following pages that it has significance for present-day cytology. Since the facts are so well known, only a brief résumé of them is given.

II

In 1876 Richard Greef reported that he had observed the parthenogenetic development of the eggs of a starfish, *Asteracanthion* (*Asterias*), to the gastrula-stage. The larvae obtained were vigorous and corresponded thoroughly with those developed from fertilized eggs. Since Greef had taken every precaution against the accidental presence of spermatozoa, since further the animals from which the eggs came gave no evidence of being hermaphroditic,¹⁾ and since, as he had learned before, fertilized eggs reach first cleavage in one to two hours after insemination, whilst these parthenogenetic ones cleaved first only at ten to twelve hours after having come into sea-water, he was certain that he had observed a true case of parthenogenesis. That he had induced parthenogenesis and had not followed a normally parthenogenetic development seems to me to be beyond question. Thus without knowing it he was the first to induce parthenogenesis in marine eggs. Evidence may be adduced upon which this judgment is based.

In the first line I place Greef's work itself. The observed great difference between the fertilized and the parthenogenetic eggs with respect to the time when they reach first cleavage points strongly to an experimental induction of development. This was probably brought about by an altered condition of the sea-water. If the eggs were crowded, carbon dioxide was present in high concentration. At the time of year, the beginning of May, when the observations were made, the water in the vessels containing the eggs most probably rose in temperature, in the absence of any precautions taken against such rise. Or, if the eggs were kept in uncovered vessels, evaporation took place. Any one of these possibilities, all well-known means for inducing parthenogenesis in starfish eggs, would account for Greef's results.

Secondly, later work on this egg may be considered. In reading O. Hertwig's report on his observations made fourteen years after Greef's, on the egg of *Asterias glacialis* and especially on that of *Astropecten*, one is struck more by his failures than his successes to obtain parthenogenesis. Were the eggs of these two starfishes normally parthenogenetic, he would have secured a higher per cent.

1) Hermaphroditism among starfish is rare. See Retzius, 1911, Vol. 16 of his collected works; and Buchner, 1911, Zool. Anz. Vol. 38.

of development; also, the development would have gone farther and would have more closely resembled that of fertilized eggs. Three years earlier, when he attempted to observe parthenogenesis in the eggs of *Asterias* and thus to repeat Greef's work, he had either changed or aerated the sea-water, so that the sea-water neither increased in hypertonicity nor in temperature nor did it become charged with carbon-dioxide. At this time he failed completely to secure development beyond the establishment of the definitive egg-nucleus. In other words, the eggs, as is normal for them, merely completed maturation in the sea-water. In the later experiments where he observed parthenogenetic development, he does not mention having protected the eggs against changes in the sea-water. The one egg that reached the blastula-stage, though seemingly normal in outward appearance, lacked the separated membrane so characteristic of the fertilized egg and of that which has been induced to develop by means of treatment with CO_2 or with increased temperature. This observation on the single blastula obtained strongly indicates in the light of my experience that Hertwig induced parthenogenesis by means of sea-water made hypertonic through evaporation (Just, 1928a).

The strongest evidence that both Greef and Hertwig induced parthenogenesis experimentally in these eggs lies in the fact that although starfish eggs are extremely responsive to experimental means, no one since has succeeded in demonstrating that they are normally parthenogenetic. My experience with the egg of *Astropecten* convinces me that it resembles those of three species of *Asterias* which I have studied, and that its classification as a normally parthenogenetic egg is unwarranted.

Since Greef, many workers have contributed largely to the literature on experimental parthenogenesis. In these contributions the results obtained, that is, the stage of development reached by the experimentally treated eggs, are so varied that at first thought they seem to defy reduction to a common basis where explanation might be possible. For instance, an agent which produces almost no change in an unfertilized egg, as revealed by the egg's capacity to respond with normal development when inseminated, is often called a parthenogenetic agent. Or the so-called parthenogenetic agent induces membrane-separation only, stimulating the egg only to the extent that fertilization is now impossible. In other cases the changes induced are so injurious that the egg does not develop though it retains capacity to fertilization, after which its development is abnormal. Or the agent induces cytolysis which begins sooner or later depending upon the agent's degree of toxicity. Whenever the

changes induced, either because of the nature of the agents themselves or the method with which they are used, do not lead to development, they should not be called parthenogenetic. And certainly death changes, i.e., cytolysis, should be placed beyond the limits of the meaning of the term, the initiation of development (Just, 1920).

If we eliminate these studies of this kind on eggs, we reach a point whence we may view our problem with sharper definition. First of all, this elimination enables us to define experimental parthenogenesis as the development of an egg initiated by means other than the living spermatozoon to at least the normal larval stage. Within the limits set up by this definition, we can make the following summarized statement which covers all cases of parthenogenesis experimentally induced in animal eggs:

1. Only when they are in their normally fertilizable period—in the germinal vesicle-, first maturation-, second maturation-stage or after complete maturation—do eggs respond to experimental means.

2. For all eggs one means acting alone—as heat, cold, acids, hypotonic sea-water, hypertonic sea-water, etc.,—is sufficient. Eggs of sea-urchins are no exception to this rule for they respond to sufficiently strong hypertonic sea-water as well as, if not better than, to the double treatment of butyric acid and hypertonic sea-water (Just, 1922a).

3. Hypertonic sea-water is most generally effective although the result is not the same qualitatively for each species of egg.

4. No experimental means is limited in its action to eggs of one fertilization-class only.

No. 4 requires comment. If we arrange eggs on the basis of their fertilization-moment in four classes, we do not find that for each of these classes one special treatment is alone successful. Heat, for example, is as successful on the egg of *Nereis* in the germinal vesicle stage as on that of *Chaetopterus* or of *Cumingia*, both in the stage of first maturation. On the other hand, eggs of the same fertilization-class do not always respond to the same means. Hypertonic sea-water does not induce cytoplasmic division in the egg of *Nereis*, but does in the egg of *Mactra*, which like that of *Nereis* is fertilizable in the germinal vesicle stage. Acid-solutions in sea-water fail to initiate development in the egg of *Nereis*; they call forth development in the egg of *Thalassemma*, fertilizable like that of *Nereis* in the germinal vesicle stage. Moreover, consider the egg of the starfish. It responds best when in that stage, first maturation, which is optimum for its fertilization. Carbon-dioxide, butyric acid or heat alone is sufficient for eliciting complete response: membrane-separa-

tion, cleavage and vigorous larvae. Butyric acid alone, however, does not initiate development in other eggs fertilizable in any stage of maturation. Shaking, which suffices for the induction of development of the starfish egg, is without effect on other eggs fertilizable in the same stage, though in the egg of *Nereis* it does cause the break-down in the ectoplasm and the dissolution of the germinal vesicle (Just, 1915).

III

As far as we know, normal development, whether initiated by spermatozoon or induced by known experimental means or by unknown natural conditions, proceeds in the same way, namely, with nuclear divisions and the sundering of the cytoplasmic mass into cells. Unfortunately, we have neglected to make nice studies on the differences in the development of two sets of eggs from the same animal, one set fertilized and the other treated with some means of inducing parthenogenesis—such differences, for example, that would reveal themselves in the size of cells and in the time and place of their appearance in an egg whose cell-lineage is known. Some differences, as rate of cleavage, we know; others, indicated for the earlier stages of development, are doubtless due to the fact that the experimental treatment never quite duplicates the action of the spermatozoon. But even if we assume that fertilized and parthenogenetically developing eggs, both in the induced and in the naturally occurring process, differ in their course of development, we know certainly that by either fertilization or parthenogenesis, if development is complete, an adult animal emerges through a succession of nuclear and cytoplasmic division. Despite any differences, therefore, that may occur during the developmental process, the beginning stage is always that of initiation of nuclear and cytoplasmic division, the end stage always the adult form. The question thus arises as to the nature of the calling forth of the nuclear configuration through whose subsequent rhythmical behavior together with cytoplasmic cleavage the end-stage is attained. The initial action of spermatozoon and of experimental means being different, and differences in action obtaining between one means and another, the question at issue is: do these differences persist so that the calling forth of the process of nuclear and cytoplasmic divisions springs from various causes or do these means, whatever they are, act in the same way to set up the division-process? I suggest that they act in the same way. Let us briefly review the experimental findings.

In sea-water sufficiently hypertonic to induce development, eggs of any species which respond to such treatment rapidly and directly lose water. The minimum hypertonicity capable of calling forth

development in sea-urchins' eggs does not bring about a sharply defined shrinkage of the eggs from their vitelline membranes (Just, 1922b); only in stronger hypertonic solutions does this egg shrink from its membrane. All other eggs shrink in hypertonic solutions to such an extent that their vitelline membranes no longer adhere to the cytoplasmic surface. On return to normal sea-water, the eggs take up water but with respect to their equilibrium with the sea-water they do not return to the untreated condition but establish equilibrium at a new and different level.

In hypotonic sea-water eggs take up water and increase in volume. If the degree of dilution is effective (Just, 1930a), the rapid intake of water induces break-down of the eggs' surface-cytoplasm and rapid distension of their vitelline membranes. Removed to normal sea-water they quickly diminish in volume but do not regain their previous state because of the complete break-down of the surface, i.e., complete ectoplasmic changes. They come again into equilibrium with the surrounding sea-water, but this, owing to the altered surface-structure, is at a new level.

After having been properly exposed to effective acids in optimum concentration in sea-water, eggs, on return to normal sea-water, separate their vitelline membranes. That is, the acid treatment induces a change which brings about the subsequent break-down in the surface-cytoplasm. With the processes of restitution by which a new surface-layer forms, the eggs come into a new equilibrium with the sea-water.

Warm sea-water when effective causes immediate break-down in the surface-layer (Just, 1915). Puncture of the frog's eggs presumably leads also to ectoplasmic break-down. Radiation, as of ultra-violet, (Just, 1933b, 1933c), brings about ectoplasmic break-down. In these cases as in the others given above, the surface-structure is altered and thus the equilibrium between egg and surroundings is different from that which existed before the treatment.

Also after fertilization, an egg having undergone complete ectoplasmic changes does not return to the state which it had before fertilization with respect to its equilibrium with the sea-water. It shows instead a marked difference. With its altered surface-layer, the fertilized egg establishes a new equilibrium with the sea-water. Fertilized eggs exhibit in their reaction to environmental influences rhythmical changes of resistance and of susceptibility that are greater than those shown by the unfertilized egg (Just, 1922c, 1928b). What few data we possess on the subject indicate that during the cleavage-cycle of an egg induced to develop by a parthenogenetic means the same rhythm obtains. Thus here the fertilized egg resembles eggs

having had experimental treatment which induced development.

Briefly stated, the case stands thus: sea-urchins' eggs induced to develop by weak hypertonic solutions lose water without complete ectoplasmic break-down, which is however induced by stronger hypertonic solutions. All other eggs respond to experimental treatment as well as to the spermatozoon with complete ectoplasmic break-down and thereby lose water. Thus movement of water follows as an effect of stimulation. In the stimulation of other cells also, as muscle-, nerve-, and gland-cells, movement of water is concerned. In view of the importance of water as part of cytoplasmic structure and behavior and as the compound present in greatest quantity in living cells, this point should be emphasized.

Structurally, the ectoplasm is a series of minute chambers of superficially located ground-substance filled with explosive material. When stimulated, best by sperm-contact, not even to the same degree by experimental means, this unstable material is exploded. There remain the ectoplasmic chambers, seen in section as a palisade of threads, prolongations of the ground-substance. This, the complete ectoplasmic break-down which I have so often described, concerns material in the ectoplasm and does not mean complete disintegration, loss, of the whole ectoplasm. It cannot in any way be considered "superficial (or incipient) cytolysis". Following loss of the exploded material, the ectoplasm at once builds up a new surface-structure.

The new egg-sea-water equilibrium is established by these structural changes in the ectoplasm; these changes do not reverse themselves and the egg does not return to the physiological state previous to treatment or to fertilization. These same changes sharply set off the developing egg, also with respect to water-movements, from the untreated and the unfertilized. Since the egg loses and gains water concomitantly with each cleavage-cycle, one cannot say that with break-down of substance in the ectoplasm it becomes permanently dehydrated. Rather, a momentary water-loss as a consequence of the stimulus of inducing means or of the spermatozoon, brings about a change to a new level with respect to equilibrium with the surrounding medium, and on this new level the ensuing rhythmical process of water-entrance and water-exit, which accompanies the developmental process, takes place.

The rhythmical movement of water during the cleavage-cycle into and out of the egg undoubtedly means a movement of water from place to place within the egg; and this in turn means local and temporary hydrations and dehydrations (Just, 1930a, 1930b). These redistributions of water even in minute intracellular dimensions create conditions favorable for reactions. One visible structure of the cell

which in addition to the ectoplasm exhibits rhythmical changes during the cleavage-cycle is the nucleus; its break-down and reformation is indeed the criterion used for defining the cleavage-cycle. The establishment of the mitotic complex constitutes the index of the completion of the initial stage of development. And I suggest that in all modes of initiating development, that of experimentally induced and naturally occurring parthenogenesis as well as that of fertilization, the establishment of the first mitotic figure is brought about by a dehydration of some constituent of the ground-substance or as the result of a reaction between nuclear and cytoplasmic ground-substance brought about by dehydration. In other words, the mitotic figure is either expressly a dehydration-formation or the result of a reaction rendered possible by dehydration. I conceive the situation as follows: in the resting egg this material in the ground-substance is spatially diffused; with the process of parthenogenesis or of fertilization it becomes aggregated—in parthenogenesis and in some cases of fertilization around the egg-nucleus, in most cases of fertilization around the sperm-nucleus. What we see as asters and as spindle may not be this material but only the sign of its activity. I have some evidence for this statement.

The hypothesis—and more cannot be proffered in the present state of our knowledge—is wholly consistent with the established facts as far as one can reduce them to order. According to it the most important factor in all modes of initiating development is a dehydration-process affecting directly or indirectly the ground-substance¹⁾. In all cases of the initiation of normal development, dehydration begins in the ectoplasm. This fact is decidedly significant for the appreciation of the rôle of the ectoplasm in the initiation of development.

Ectoplasmic changes alone, as I have shown above, are not experimental parthenogenesis. There are eggs that respond to treatment with membrane-separation but do not develop farther. By denominating the changes which call forth membrane-separation experimental parthenogenesis, workers have confused this already difficult subject by making such membrane-separation in eggs that do not cleave, synonymous with complete development. This misconception arose out of our knowledge that normal development—both in fertilization and in parthenogenesis—always begins with some visible changes at the egg-surface. But these are but a reliable indicator for the quality of the development, if this ensues; they do not of themselves determine that development will follow. That

1) Delage in 1901 promulgated a dehydration-theory of fertilization; but this differs from the one here presented.

there are such cases of ectoplasmic changes without subsequent development on the one side and that the sea-urchins' egg after treatment with weak hypertonic sea-water develops without complete break-down of ectoplasmic substance on the other, warns us against attributing the cause of experimental parthenogenesis directly to physical changes at the egg-surface, i.e., to membrane-separation. Only when these changes at the egg-surface facilitate the subsequent rhythmical phenomena that comprise the developmental process does complete development follow.

The significance of the method of calling forth development in sea-urchins' eggs with butyric acid and hypertonic sea-water lies in the fact that through the action of butyric acid in calling forth membrane-separation, cleavage and larvae are qualitatively better than those that result from treatment by weak hypertonic sea-water alone; development is thereby improved. By the action of stronger hypertonic sea-water, which singly acts as butyric acid and weak hypertonic sea-water together, development is also improved. On the other hand, whenever the ectoplasm is injured, membrane-separation is impaired and development is vitiated. For eggs generally it holds that that experimentally induced parthenogenetic development is best which sets in with most normal ectoplasmic changes. Far from being an exception to be explained away, the case of sea-urchins' eggs in responding to treatment with the weak hypertonic sea-water without membrane-separation and with poor quality of development reveals clearly what other eggs more sensitive in their ectoplasmic response to experimental means do not: the ectoplasmic changes are significant for the development in prospect. Again, as in fertilization, we see that the quality of development depends upon the quality of these initial ectoplasmic changes.

IV

The suggestion that in the initiation of the egg's development, in both parthenogenesis and fertilization, dehydration plays the leading rôle by no means pretends to state in final terms the manner in which either spermatozoa or experimental means bring about the development. Moreover, whereas evidence indicates that fertilization is a chemical union between an egg-substance and the spermatozoon, the diversity of experimental means,—as the extremes, heat and cold or hypo- and hyper-tonic sea-water, for example,—and the lack of any common factor to which we could relate their efficacy, forces us to assume that the initial action of the experimental means is physical. But the end-result, however initiated, is the same—a rhythm of mitosis and of cytoplasmic cleavage which

leads to embryo-formation. The conclusion is therefore clear: the egg, like many another living cell—nerve or muscle, for example,—possesses independent irritability. It has full capacity for development. Neither spermatozoa nor experimental means furnish the egg with one or more substances without which the initiation of development would be impossible.

Here lay at the same time the possibilities and the failure of the work on experimental parthenogenesis. Every single investigator who erred in "proving" an external agent (or agents) to be the cause of development neglected an opportunity to extend our knowledge concerning that fundamental manifestation of living matter, its independent irritability (Just, 1930b).

Thus experimental parthenogenesis far from being a solved problem invites further investigation because of its implications for the biology of cells generally. Every datum bearing upon the independent irritability of living matter has significance for the cytologist who encompasses in his conception of the cell the sum-total of cellular organization. When therefore I emphasize, as I have done so frequently, ectoplasmic structure and behavior in vital manifestations (Just, 1931, 1932, 1933a), I do not overlook the fact that the protoplasmic system is the unit with which biologists deal (Just, 1936). The evidence, for the rôle of the ectoplasm in various biological processes, both normal and experimental, warrants this emphasis. Living matter is by chemical constitution and by display of physical attributes a derivative of non-living. It can never be divorced from its milieu. Our investigations of it, however much for purposes of more refined and exact study we abstract it from its surroundings, should never lose sight of the fact that the cell as organism is part with and of its environment. This relation of cell to outside world is revealed by protoplasmic irritability. This irritability is apparently bound up with hydration, as I have aimed to show in the foregoing, and the further investigations of the hydration-processes might very well establish it as the key-reaction of irritability. The highest expression of irritability reveals itself in the outer cell-boundary, the ectoplasm.

Literature Cited

- Delage, Y. 1901. Les théories de la fécondation. Verh. V. Internat. Zool. Congress Berlin.
- Just, E. E. 1915. Initiation of development in *Nereis*. Biol. Bull. Vol. 28.
- 1920. The fertilization-reaction in *Echinarachnius parma*. IV. A further analysis of the nature of butyric acid activation. Biol. Bull. Vol. 39.
- 1922a. Initiation of development in the egg of *Arbacia*. I. Effect of hypertonic sea-water in producing membrane separation, cleavage and top-swimming plutei. Biol. Bull. Vol. 43.

- Just, E. E. 1922b. Initiation of development in the egg of *Arbacia*. II. Fertilization of eggs in various stages of artificially induced mitosis. Biol. Bull. Vol. 43.
- 1922c. The fertilization-reaction in *Echinarachnius parma*. V. The existence in the inseminated egg of a period of special susceptibility to hypotonic sea-water. Amer. Jour. Physiol. Vol. 16.
- 1928a. Initiation of development in the egg of *Arbacia*. V. The effect of slowly evaporating sea-water and its significance for the theory of auto-parthenogenesis. Biol. Bull. Vol. 55.
- 1928b. Studies on cell-division. II. The period of maximum susceptibility to dilute sea-water in the cleavage-cycle of the fertilized egg of *Arbacia*. Physiol. Zool. Vol., I.
- 1930a. Hydration and dehydration in the living cell. III. The fertilization-capacity of *Nereis* eggs after exposure to hypotonic seawater. Protopl. Bd. 10.
- 1930b. The present status of the fertilizin-theory of fertilization. Protoplasma, Bd. 10.
- 1931. Die Rolle des kortikalen Cytoplasmas bei vitalen Erscheinungen. Naturwissenschaften, 19. Jahrg.
- 1932. On the origin of mutations. Amer. Naturalist, Vol. 66.
- 1933a. Cortical cytoplasm and evolution. Amer. Naturalist, Vol. 67.
- 1933b. A cytological study of effects of ultra-violet light on the egg of *Nereis limbata*. Zeitschr. Zellf. mikr. Anat. Bd. 17.
- 1933c. Observations on effects of ultra-violet rays upon living eggs of *Nereis limbata* exposed before insemination. Roux' Arch. Entw. Mech. Org. 130.
- 1936. A single theory for the physiology of development and genetics. Amer. Naturalist, Vol. 70.
-

Über eine triploide Pflanze von *Chrysanthemum*

Von

Naomasa Shimotomai, Hiroshima
z.Z. Berlin-Dahlem

Chrysanthemum frutescens ist als eine Zierpflanze in fast allen Ländern kultiviert. Diese Pflanze ist aber cytologisch nur von TAHARA (1914–1915, 1921) untersucht worden. Er fand, daß bei der ersten Teilung in der Embryosackmutterzelle die univalenten und bivalenten Chromosomen ganz regellos auf der Spindel zerstreut sind. Er konnte daraus keinen Schluß ziehen, weil ihm die Bestimmung der Zahlen der univalenten und bivalenten Chromosomen und auch die der somatischen Chromosomen unmöglich war. Aber seine Beobachtung zeigt die Tatsache, daß diese Pflanze eine abnorme Eigenschaft haben muß.

Um die Arbeit TAHARAs zu ergänzen, habe ich diese Pflanze untersucht. Die Wurzelspitze wurde mit NAWASCHINS Fixierungsflüssigkeit fixiert und mit NEWTONS Gentianaviolett-lösung gefärbt. Figur 1a zeigt die Chromosomen aus einer Zelle der Wurzelspitze. Man erkennt mit Sicherheit 27 Chromosomen, 3 mal 9, der Grundzahl von *Chrysanthemum*. Die Meiose in den Pollenmutterzellen wurde unter Benutzung von Eisen-Karminessiglösung BEL-LINGS beobachtet. Bei der Metaphase der ersten Teilung treten immer trivalente Chromosomen und auch univalente und bivalente Chromosomen auf. Die relative Zahl der dreierlei Chromosomen ist nicht bestimmt. Die trivalenten Chromosomen sind in der Zahl am größten. Ihre Formen können, wie Figur 1b zeigt, verschieden sein. Aus der oben geschilderten Beobachtung folgt, daß diese Pflanze autotriploid ist.

Chrysanthemum frutescens wächst wild auf den Kanarischen Inseln. Die im Garten als *Chrysanthemum frutescens* bekannte

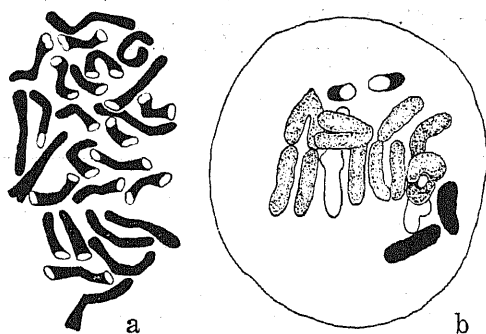


Fig. 1. *Chrysanthemum frutescens* (cult.). a, Chromosomen aus einer Zelle der Wurzelspitze, 27 Chromosomen sichtbar. b, Seitenansicht der Metaphase der ersten Teilung in P.M.Z. Vergröß. 2100 \times .

Pflanze hat eine andere Form als die wilde; die Blätter sind größer und breiter, die Stengel höher. Daher kann man nicht vermuten, daß auch das wilde *Chrysanthemum frutescens* triploid sei.

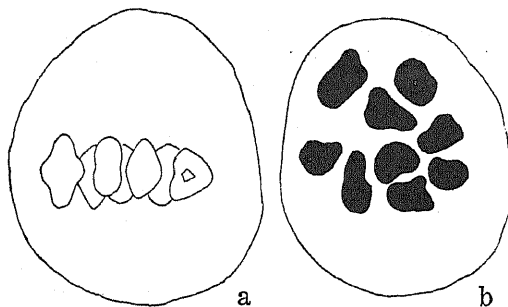


Fig. 2. *Chrysanthemum filifolium*. Seiten- und Polansicht der ersten Teilung in P.M.Z. Vergröß. 2100 \times .

Schließlich möchte ich hier auch noch die Chromosomenzahl einer anderen Art von *Chrysanthemum* von den Kanarischen Inseln, nämlich *Chrysanthemum filifolium*, hinzufügen. Wie Figur 2 zeigt, beträgt die gametische Chromosomenzahl dieser kanarischen Pflanze 9. Die Meiose geht hier ganz normal vor sich.

August 1936, Berlin-Dahlem

Zitierte Literatur

- Tahara, M. 1914-1915. A cytological study on *Chrysanthemum* (Japanisch mit engl. Zusammenfassung). Bot. Mag. (Tokyo), 28, 29.
 — 1921. Cytologische Studien an einigen Kompositen. Journ. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo, 43, Art. 7.

Chromosome Structure XI.
Hordeum vulgare L. and *Secale cereale* L.¹⁾

By
M. L. Ruttle and B. R. Nebel

Introduction

At all stages of somatic mitosis a chromosome of *Tradescantia reflexa* Raf. is optically divided into two more or less well-separated chromatids each of which is again resolvable longitudinally into half-chromatids. The half-chromatids which compose a chromatid are, from prophase until the following telophase, more closely approximated than the chromatids which compose a chromosome. A chromosome except at telophase and early interphase thus may be regarded as consisting of four discrete threads arranged in pairs.

At metaphase in good preparations eight threads can be seen, visible multiplication of threads occurring at this stage. If actual multiplication occurs during interphase or prophase this can not be resolved with visible light until metaphase. By the division of the metaphase chromosome at anaphase the number of threads is again four.

The number of threads per chromosome is the same in the last archesporial division as in any other somatic division. There are four threads clearly evident at the last pre-meiotic telophase, interphase and preleptotene prophase. Four threads per chromosome are present but less evident during leptotene and early pachytene, the threads having become closely re-associated at these stages. The four threads per chromosome are again clearly evident at diplotene and diakinesis.

At first metaphase and anaphase although only four threads per chromosome were observed in *Tradescantia*, eight were observed in *Trillium*. There are also, most probably eight threads per chromosome in *Tradescantia* at these stages. This number was present at first telophase and during interkinesis. At second metaphase since no further multiplication of threads takes place there are still eight visible threads per chromosome which by the metaphase division of the chromosome becomes four threads at anaphase. The second anaphase chromosome thus resembles that of somatic mitosis.

1) Approved by the Director of the N. Y. State Agricultural Experiment Station as Journal paper 159. August 20th 1936.

The coiling, thickening and approximation of the threads of the chromosome at the different stages of the nuclear cycle account for the various appearances of the nucleus at these stages.

The above presents in brief an outline of the results as regards the number of threads per chromosome obtained in a series of studies on chromosome structure in *Tradescantia reflexa* Raf. (Nebel, 1932; 1933 *a, b*; 1935 and Nebel and Ruttle, 1936). The observation of such early workers as Merriman (1904, on *Allium*), Bonnevill (1908, figs. from *Ascaris*) and others and the findings of such later workers as Goodspeed, Uber and Avery (1935), Stebbins (1935), Sax and Sax (1935), Huskins and Smith (1934, and 1935) and others are in part corroborative.

Since the results of Nebel and others apply principally to such very large chromosomes as those of *Tradescantia* it seemed desirable to extend the observations in regard to thread number to plants with somewhat smaller chromosomes. For this purpose the chromosomes of barley, rye, and crocus were chosen for study.

Material and Methods

Anthers of *Hordeum vulgare* L., variety Alpha, of *Secale cereale* L. and *Crocus biflorus* var. *Weldeni albus* were fixed for one to four hours in acetic acid alcohol 1:4, smeared and stained with iron-aceto-carmin (the carmin used was carmin alum lake). Fixation, for approximately 15 to 30 minutes previous to the acetic alcohol, in acetic-alcohol the alcohol of which was saturated with picric acid improved the staining quality of the fine threads in the archesporial and leptotene stages as well as in the different somatic stages obtained from the anther tissue.

Permanent smears were made by the McClintock method except that clove oil or bergamot oil was introduced after the 100 per cent alcohol and just previous to mounting in euparal. Most drawings were made with the aid of camera lucida from impermanent slides, optics being 1.4 N.A. objective and condenser. Photographs were made and used to supplement the aceto-carmin material for drawings in order that the drawings should be as nearly photographic as possible.

Observations

Mitosis

The number of threads in the chromosomes of barley and rye have been followed wherever visible in the various stages of somatic and meiotic mitosis.

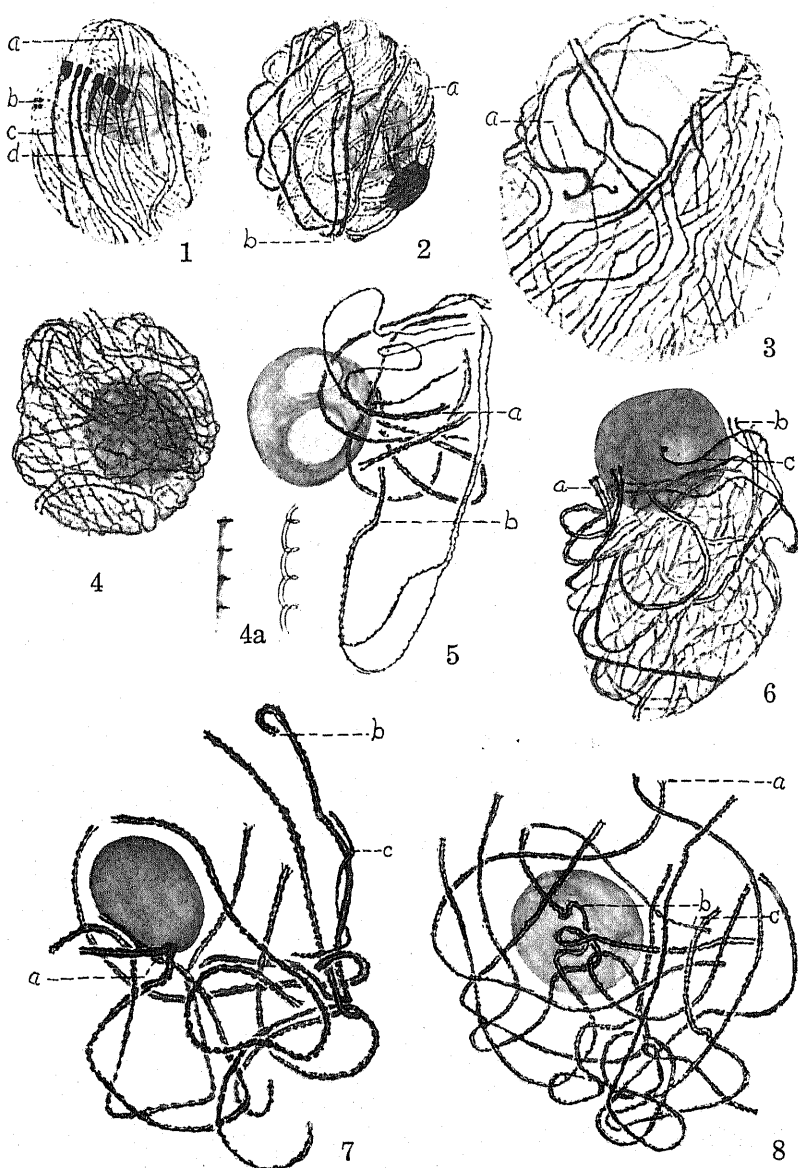
At somatic metaphase in barley there are fourteen elongate chromosomes with median, submedian or subterminal kinetochores.

One pair may be readily identified by the sharply constricted knobs. This pair appears to be the nucleolus-forming pair observed at pachytene (figs. 7 at *a* and 8 at *b*). One particular plant examined had a fragment which is evident at *c* in figs. 7 and 8, and at *a* in fig. 11. In rye the somatic complex at metaphase is in general very similar to that in barley. The fourteen chromosomes have subterminal to submedian or median attachment constrictions. There is one pair each chromosome of which bears a large terminal knob. At metaphase in both rye and barley the chromosomes usually stain heavily with aceto-carmines so that the number of threads per chromosome could not be observed. Occasionally more structure was observable as in fig. 20 at *a* and *b*, from rye. This shows each chromosome at metaphase four-partite. The relational coiling of the chromatids is also evident.

As the chromosomes approach the poles at anaphase the structure becomes more apparent. The bi-partite structure of the anaphase chromosome was frequently visible. The quadripartite structure was less evident but at times showed clearly in late anaphase. Fig. 16 shows three chromosomes from a late anaphase of rye, each of which shows four fine threads per chromosome. At telophase four threads per chromosome can frequently be seen especially when the chromosomes are viewed from the end as in fig. 17, from barley. The four threads per chromosome were also clearly visible at this stage in both rye and crocus. In very late telophase the separation of the four threads except at the kinetochore and the formation of four-thread tracts may be observed. The four threads apparently may remain somewhat separated throughout early interphase and later become shoved together in pairs so that the chromosome tracts tend to appear bipartite throughout later interphase (fig. 18, from rye), early and later prophase (fig. 19, from rye) and prometaphase. These show unquestionably quadripartite granule groups at *a* even though the threads seldom appear visibly so in this material. Correspondingly the observed four-partite metaphase chromosomes from rye (fig. 20 at *a* and *b*) are most probably eight-partite as in *Tradescantia* since four threads per chromosome are plainly discernible during late anaphase and early telophase (figs. 16 and 17).

Four threads per chromosome can also be observed at late second anaphase and at second telophase (fig. 15, from barley). These stages are essentially mitotic and in consequence further indicate the somatic number of threads per chromosome.

Archisporial cells and nuclei of rye were more easily obtained than those of barley. The last premeiotic telophase was quite similar to the somatic telophase (fig. 17) and showed four threads per



Figs. 1-8. Last premeiotic division and early meiosis in barley and rye. $\times 3200$. 1. Last premeiotic interphase from archesporium of rye showing sister-chromatids arranged in pairs as at *a*, trace of half-chromatids as at *b*, sister-chromatids tightly approximated as at *c*, and paralleling of chromosomes at *d*. 2. Early prophase of last premeiotic division from rye. Sister-chromatids pairing at *a* and chromosomes in parallel at *b*. 3. Leptotene from rye. Early pairing of homologues at *a*. 4. Leptotene from barley. Sister-chromatids not now evident. 4*a*. Illustration to show how chromatids have become shoved together. 5. Amphitene from rye. Synapsis almost complete. Ends paired at *a* and *b*. 6. Late amphitene from barley. Synapsis almost complete at *a* and *b*, no pairing at *c*. 7. Mid pachytene from barley showing chromosome pair attached to nucleolus at *a*, primary split and secondary split at *b*, and split fragment at *c*. 8. Early pachytene from barley showing nucleolar chromosome pair at *b*, two chromatids in each homologue at *a* and in fragment at *c*.

chromosome. The last premeiotic interphase (fig. 1) was in thread number similar to the typical somatic interphase (fig. 18) and usually showed two threads per chromosome, four threads rarely being discernible as at *b* in fig. 1 where the granule is four-partite. The last premeiotic interphase showed, however, in addition to the typical paralleling of chromatids at *a* the very close re-association of chromatids at *c*. Such a re-associated chromosome appeared quite frequently to be accompanied in parallel by a second similarly re-associated chromosome as at *d*, possibly its homologue. This latter observation was more marked in the later last premeiotic early prophase shown in fig. 2 at *b* in which the chromatids have become more closely associated as at *a*.

At the last premeiotic interphase and early prophase the distinct arrangement of the chromatids in pairs of threads (fig. 1 at *a* and fig. 2 at *a*) suggests homologous pairing but the nucleus is at these stages, strictly speaking, somatic (compare fig. 18) and this is the somatic re-approximation of chromatids. That this is the pairing of sister chromatids can also be determined from observation of the different character of the threads at the time of homologous pairing in leptotene, amphitene and pachytene.

Meiosis

As growth proceeds in such archesporial nuclei as those in figs. 1 and 2, the chromatids and half-chromatids of the chromosome become tightly appressed and some approximation of homologues begins. Enlargement of the cell and nucleus occurs, the chromosomes loosen up and spin out and assume the typical leptotene appearance as in fig. 4 from barley and fig. 3 from rye.

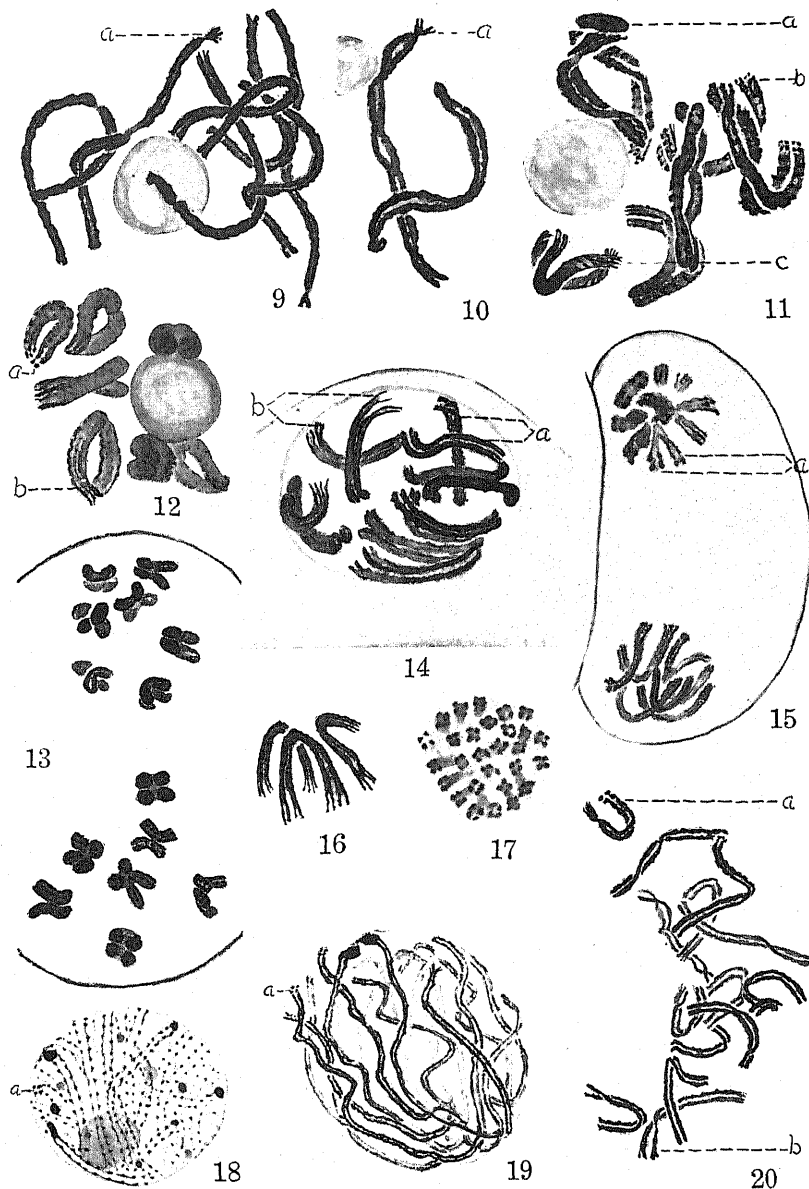
During later leptotene in both barley and rye the chromosome usually appears as a coiled thread with elongated narrow gyres so fine and so tightly appressed are the four half-chromatids which compose it. Occasionally at the ends of a chromosome or where a loop is drawn out of the whorl the two chromatids which comprise the leptotene thread may show. Accordingly the leptotene chromosome may be regarded as composed of two very fine coils so tightly shoved together and so attenuated that they are not usually resolvable (figs. 4 and 4*a*). The re-association of these fine coils and the attenuation of the threads occurred during preleptotene. While the doubleness of the leptotene thread is comparatively clear, the re-association of the half-chromatids is so complete at this stage that the quadri-partite nature of the thread which was quite evident at the preceding telophase could at this stage only be conjectured.

Some approximation of homologous chromosomes may be observed to be taking place at leptotene and earlier so that occasionally nuclei were found in which both pairing of sister chromatids and homologous pairing were in progress. In such nuclei approximating homologues could be observed (figs. 1 and 2) the chromatids of which were closely re-associated in the region of homologous pairing but were still quite widely separated in regions in which homologous pairing had progressed less far.

As amphitene proceeds the homologous chromosomal threads become arranged more and more in parallel (figs. 3, 5 and 6). This may be accompanied by marked "whorling" of the threads. The homologues appear to approach each other gradually along their length, becoming more and more nearly approximated and finally in early pachytene becoming tightly synapsed while they are still long and quite fine. No absolute evidence that synapsis begins at certain loci for example one end or any intermediate point was deduced from this material. Ends, however, were found tightly approximated in cases where little other close pairing could be observed (fig. 3 at *a*). In fig. 5 at *a* and *b* and fig. 6 at *a* and *b* the ends are also paired but in these cases pairing is well advanced.

During early pachytene no trace of the quadruplicity of individual chromosomes could be observed in barley. In rye occasional less complete pairing was observed at certain loci and at such places quadrupleness of a chromosome was faintly evident. The four chromatids per bivalent were readily visible in both plants at early and late pachytene. This was observed particularly at the ends in barley (fig. 7 at *b* and 8 at *a*) but could be followed throughout the length of any pair in rye. The chromatids in the fragment in fig. 8 at *c* can also be clearly seen.

Close synapsis in pachytene lasts for a considerable period during which the tightly synapsed bivalents become progressively shorter and thicker. Measurements of chromosome shortening in rye correspond in detail with those made by Sax (1930) and Sax and Sax (1935) on the same plant. Measurements of very early and very late pachytene in rye show a progressive shortening of three to four times. Measurements of less early and less late pachytene in barley show a contraction of two to three times. This shortening in length in the chromosome continues after the diplotene pairs have opened out until metaphase. In rye comparison of the length of a chromosome at early pachytene and at metaphase show that the length has decreased approximately eleven times. In barley a similar comparison shows a decrease in length of approximately nine times. Contraction from very late pachytene in rye to metaphase is



Figs. 9-15. Meiosis. 9. Very late pachytene from rye. Two chromatids in each chromosome show at *a*. $\times 2400$. 10. Early diplotene from rye. $\times 2400$. 11. Late diplotene from barley. Four threads per chromosome show as *b* and *c*. $\times 2400$. 12. Diakinesis from barley. Four threads per chromosome evident at *a* and *b*. $\times 2400$. 13. First anaphase from barley showing 2 chromatids in each chromosome. Some evidence of chromatid split present. $\times 2400$. 14. Interkinesis from barley showing clearly eight threads per dyad chromosome, four in each half dyad as at *a* and *b*. $\times 3200$. 15. Early second telophase from barley showing each chromosome to be 4-partite as at *a*. $\times 3200$. Figs. 16-20. Somatic mitosis in barley and rye. 16. Somatic anaphase from rye showing four threads per chromosome. $\times 3200$. 17. Somatic telophase from barley showing four threads in each chromosome. They could also be observed from side view. $\times 3200$. 18. Somatic interphase from rye showing pairs of chromatids with granules. Certain granules as at *a* quadri-partite. $\times 3200$. 19. Somatic late prophase from rye showing pairs of sister-chromatids and four threads per chromosome rarely at ends as at *a*. $\times 3200$. 20. Somatic metaphase showing four threads per chromosome and relational coiling. $\times 2400$.

three times and from less late pachytene in barley to metaphase in barley approximately five times.

As the bivalents enter late pachytene (fig. 9) there is considerable nuclear contraction. Shortly thereafter relaxation of synapsis begins and the pairs open out except at chiasmata (fig. 10).

At diplotene as the homologues open out and contract still more the ends of each chromosome show the four-partite condition (fig. 11 at *b*). This may also be observed from a side view where the threads are frayed out (fig. 11 at *c*). The four threads per chromosome may also be observed at late diakinesis (fig. 12 at *a* and *b*) although the formation of the major coil has rendered the chromosomes shorter and more compact. There is no evidence of coiling during synapsis of such a type as Darlington wishes to make responsible for crossing-over.

At first metaphase by the method of preparations here used in both barley and rye the seven pair of chromosomes are compactly coiled and the number of threads per chromosome not discernible.

As first anaphase proceeds the dyad chromosomes again stain less densely. The two component halves of each dyad separate except at the kinetochore. Each half-dyad is clearly bipartite (fig. 13). Thus each dyad chromosome of first anaphase contains four chromatids rather than two as are contained by other anaphase chromosomes.

In this material interkinesis may be regarded as a key stage to the thread number. As the dyad chromosomes enter interkinesis the dyad halves remain separated except at the kinetochore as at first anaphase and, in addition, fray out at the ends so that four threads arranged in twos are clearly visible at the end of each half-dyad (fig. 14, chromosomes *a* and *b*). This gives eight discrete threads per dyad chromosome at interkinesis. As interkinesis progresses the chromosomes elongate considerably but the thread number can often be quite readily observed especially at the half-dyad ends.

At second metaphase the half-dyads separate. Each chromosome of second anaphase is essentially an unchanged half-dyad of interkinesis, no multiplication of threads having occurred at second metaphase. At late second anaphase and telophase the number of threads in each chromosome is clearly four (fig. 16).

The nucleolus in early leptotene appears centrally located (fig. 4). As amphitene proceeds it passes to one side and often appears as a cap to a jar (fig. 6). It is visible until late diakinesis becoming progressively more vacuolate and less densely staining. One pair of chromosomes was observed in barley which is attached to the

nucleolus (figs. 7 at *a* and 8 at *b*), and also in rye. These resemble those described by McClintock (1934) in *Zea mays* and probably function similarly.

The granules figured in the somatic interphase and last premeiotic archesporial nuclei of rye (figs. 1 and 18) could be used in identifying chromosome tracts.

Discussion

In Table 1 are given the number of threads per chromosome observed during different stages of the somatic, of the last archesporial and of the first and second meiotic mitoses by different workers. Investigators in a particular group in Table 1 are placed together on the basis of general agreement in observations and conclusions as regards the number of threads in chromosomes at certain stages of mitosis and meiosis. Each individual in a group may not have observed each particular stage listed. Interpretation as to the character, origin and disposition of the threads is not taken into consideration in forming the groups as for example in grouping Merriman (1904, *Allium*), Bonnevie (1908, *Ascaris*) and Taylor (1922, *Gasteria*) who all observed four threads per chromosome but who interpreted their observations differently.

In the table the different stages of mitosis, metaphase, anaphase, telophase, interphase, early and late prophase are designated by the letters, M, A, T, I, ePr, lPr, corresponding each to each. Similar letters apply to the stages of the last archesporial division. In meiosis the stages leptotene, early and late pachytene, diplotene, diakinesis, first metaphase, anaphase and telophase, interkinesis, second metaphase, anaphase and telophase are designated by the letters L, ePa, lPa, Dip, Dia, M_I, A_I, T_I, I, M_{II}, A_{II} and T_{II}, respectively. The sign < indicates chromosome division, > indicates chromosome pairing and << indicates chromosome separation at first metaphase. The circle surrounding the figures at interphase indicates that the thread number could not be followed in any detail at that stage.

The table shows that the number of threads per chromosome throughout somatic mitosis has been differently conceived by different workers. Much of the earlier work such as that of Grégoire (1907), Sharp (1920), Overton (1921) and others as well as the later work of Belling (1933), Darlington (1931) and others regards the somatic chromosome as a simple unit which prepared for the metaphase division by splitting into two parts at interphase or early prophase. Other earlier work (Bonnevie, 1908; Dehorne, 1911, diag., p. 635; Lundegårdh, 1912; Digby, 1919, diag. p. 139; Robertson, 1916; 1931

Table 1.
Number of threads observed by different workers in large plant and animal chromosomes at different stages of somatic and meiotic mitosis

Workers	Number of threads per chromosome during									
	Any somatic mitosis					The last archesporial				
	M	A	T	I	ePr	1Pr	M	A	T	I ePr
First and second meiotic mitosis										
	L	ePa	lPa	Dip	Dia	M _I	A _I	T _I	I	M _{II} A _{II} J _{II}
Digby (1919, diag. p. 139) and others	2<1	2(4?)	2	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Grégoire (1907), Sharp (1920), Overton (1921) and others	2<1	1	1	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Darlington (1931, 1935), Belling (1933), Kuwada & Nakamura (1935) & others	2<1	1	1	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Lundegårdh (1912), Robertson (1916, 1931), McClung (1927), Lorbeer (1934) & others	4<2	2	2	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Merriman (1904), Bonnevie (1908), Taylor (1922)	4(8?)<4	4	4	4	4	4	4	4	4	4<1 4
Kaufmann (1926, 1931), Sharp (1929), Hoare (1934), Sax (1930) & others	4<2	2	2	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Nebel (1932, 1933a, b), Stebbins (1935)	4(8?)<4	2(4?)	4	4	4	4	4	4	4	4<1 4
Huskins (1932, 1933), Huskins & Smith (1935a, b)	4<2	2	2	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Sax & Sax (1935), Marshak (1935), Gettler (1935), Makino (1936) dyad only	4<2(4?)	2	2	2	2	2	2	2	2	2<1 2
Nebel (1935), Nebel & Ruttle (1936), Goodspeed, Uber & Avery (1935)	8<4	4	4	4	4	4	4	4	4	4<1 4
Nebel & Ruttle (1937), Present study	4?<4	4	4	2-4	4	4	4	4	4	4<1 4

All work listed was done on large plant chromosomes excepting that of McClung and Robertson.

and others) regards the somatic chromosome as essentially a double structure which with the possible exception of anaphase is divided into two parts throughout its cycle.

Quadruplicity of the threads in a chromosome at somatic telophase and prophase (Table 1) is figured in different plants and animals by several early workers (Merriman, 1904; Bonnevie, 1908; Digby, 1919 and others). These observations were later largely disregarded because of poor fixation, misinterpretation of other observations and lack of any adequate conception of the constancy of the chromosome number, morphology and structure.

As later work established a more adequate view of the constancy of chromosome number and morphology the finer details of chromosome structure have become solvable. Kaufmann (1926, 1931), Sharp (1929), and others have shown that the chromosome is in part a quadruplicate structure and have re-affirmed the coiled nature of its component threads. Nebel (1932) showed not only that there are four of the spiralled threads throughout mitosis but that these are continuous through the resting stage. This work has been corroborated and extended by Nebel (1933 *a, b*, and 1935) and by Nebel and Ruttle (1936).

The present study of the somatic chromosomes of barley and rye at anaphase, telophase, interphase and prophase and of crocus at telophase indicates that in these plants also the chromosome is an essentially quadruplicate structure there being four threads present at all stages in which thread number could be clearly ascertained. These four threads appear to thin out during telophase so that the threads appear to separate from each other except at the kinetochore. The threads (half-chromatids) exist as pairs of slender parallel spirals (chromatids) with narrow gyres during interphase which pairs become closely re-associated during prophase. This agrees with the observed conditions in *Tradescantia* (Nebel, 1933 *b*, 1935, and Nebel and Ruttle, 1936) except that the four-partite condition of the chromosome could not be observed during interphase (see Table).

The "apparent" singleness of the leptotene thread confused the interpretation of many early observations and lead to erroneous theories. Thus Digby (1919, p. 139) having observed the bipartite structure of the somatic chromosome and further the bipartite telophase and early prophase chromosome in the last archesporial division before meiosis confused the earlier pairing of chromatids with the later pairing of homologues on account of the fact that the sister chromatids re-associate so very closely previous to leptotene. This

re-association of chromatids previous to leptotene was identified by McClung (1927), Robertson (1931) and others.

As it became established that it was true side by side synapsis which occurs at the stages described by Digby and others of this school as pairing of chromatids, the alternate view that the leptotene chromosome is unsplit became accepted as fact (Grégoire, 1907; Overton, 1921; Kuwada and Nakamura, 1935; Emsweller and Jones, 1935 and others) and as such incorporated by Darlington (1931), Huskins (1932) and Belling (1933) in their respective theories. Thus Belling supported his theory of crossing-over on among other things "the absence of longitudinal division in the chromatid at leptotene" and the "absence of any telophasic split". Similarly Darlington (1931) presuming that the leptotene chromosome is single formulated his precocity theory of meiosis according to which pairing occurs because a precocious contraction takes place before the leptotene chromosome has split. Also Huskins (1932) and Huskins and Smith (1935 *a, b*) considering the leptotene chromosome to be unsplit argued that a premeiotic inhibition of splitting rather than a precocious contraction may initiate meiosis.

Meantime evidence was accumulating that the preleptotene thread is split, that the chromatids re-associate very closely and that the homologues then pair. Thus Lundegårdh (1912), Robertson (1916, 1931) McClung (1927, 1928) and others recognized the point of true homologous pairing at leptotene and later as well as the re-association of chromatids previous to this time. More recently Lorbeer (1934), Sax and Sax (1935), Stebbins (1935), Nebel (1935), and others have concluded from their observations that the leptotene chromosome is at least bi-partite.

The early leptotene thread of rye and barley is a duplicate structure. Its quadruplicity could be conjectured only from the fact that at the last premeiotic telophase, the chromosome is definitely four-partite. Some evidence of quadruplicity could be obtained at early interphase. Re-association of chromatids in interphase and early prophase was quite evident and at times extended into early leptotene. The re-association of chromatids and homologous pairing could often be observed in the same preleptotene cell. Huskins and Smith (1935) made somewhat similar observations on *Fritillaria* but interpreted the split leptotene as due to "precocious splitting" which was in some way associated with the later occurring regional pachytene association of homologues. In barley and rye synapsis at pachytene is complete, close and of considerable duration. Accordingly the early split leptotene chromosome seems here interpretable only on the basis of the observed telophasic and interphasic split and the later

apparently single leptotene chromosome on the basis of chromatid re-association during preleptotene, which re-association may even be occurring in cells in which homologous pairing is in progress, the former invariably preceding the latter. In *Tradescantia* the preleptotene split was still distinctly visible at leptotene (Nebel and Ruttle, 1936) so that evidence that the chromosome at this stage is composed of four threads arranged in pairs is more conclusive than in barley and rye.

Nebel (1935) and Nebel and Ruttle (1936) have shown that the chromosome in *Tradescantia* from first until second metaphase is an eight-partite structure duplication of threads having occurred at first metaphase or earlier. This number of threads is then maintained throughout first anaphase, telophase, and interkinesis. At second metaphase by the division of the chromosome the number of threads is at second anaphase four and the usual somatic number of threads per chromosome restored. In barley and rye it was possible to count eight threads per chromosome very clearly at interkinesis so that although the number of threads could not be observed at first anaphase, first telophase or second metaphase it seems clear that at these stages there are also eight threads per chromosome. At second anaphase and second telophase there were four threads per chromosome. This again indicates that these plants have the same number of threads per chromosome as are found in *Tradescantia*.

Coiling and chiasmatization have been described in rye by Sax (1930, 1935), Sax and Sax (1935), and Darlington (1933) and have been for the most part neglected in these studies. The pachytene thickening and shortening to metaphase agrees with the observations of Sax (1930) and others. The major coil described by Sax (1930) is evident but is undoubtedly four-partite and probably eight-partite as in *Lilium* (Goodspeed, Uber and Avery, 1935) and as in *Tradescantia* (Nebel and Ruttle, 1936).

The spatial integrity of the gemini after synapsis strongly suggests that homologous threads are brought together by gradual approximation proceeding from some one point as described by Robertson (1931) in the *Tettigidae*, McClintock (1933) in *Zea mays* and others. This would allow of the disentangling of the chromosome pairs and would tend to prevent non-homologous chromosomes which may be lying across the path of a synapsing pair becoming interlocked with this pair. Such interlocking has been described for *Tradescantia* (Sax and Anderson, 1934) and has been recorded in certain other plant and animal chromosomes. Interlocking in rye and barley appears to be much less frequent than in *Tradescantia*. Where interlocking is frequent as in *Campanula*, *Oenothera*, *Sala-*

mandra, *Stenobothrus* (after Sax and Anderson, 1934) synapsis may be originating simultaneously at various regions of homologous chromosomes.

Since the quadripartite chromosome has so far been observed only in plants having comparatively large chromosomes it is too soon to say that this condition extends into plants and animals having much smaller chromosomes. The observations of Nebel and Ruttle (1937) on *Dissosteira carolina* L. show that the chromosomes of the grasshopper are essentially quadripartite although at many stages the half-chromatids are so closely associated that they can not be resolved with the present technique.

In the grasshoppers it has been previously clearly demonstrated (McClung, 1927; Robertson, 1916, 1931 and others) that the leptotene chromosomes are split before they enter upon synapsis. Our recent study on *Tradescantia*, *Trillium*, *Hordeum*, *Secale* and *Dissosteira* carry this observation one step further and show that the chromosomes of these organisms are not only split but doubly split before they enter upon synapsis. Very close re-association of the half-chromatids and chromatids, however, occurs previous to and during early synapsis so that synapsis as described by Robertson (1931) may be regarded as consisting of two steps "The bringing together of the split halves" (and in this case also of the halves of the split halves) "of a chromosome first and later each pair of (in this case doubly) split homologues". The almost complete obliteration of the presynaptic splits at leptotene may be thought of as due to the chromosome attenuation following re-association.

Thus barley and rye fit into the presented scheme for *Tradescantia* in which the chromosome is an essentially quadruplicate structure the four chromonematic threads of which at different nuclear stages may be more or less thickened, coiled and closely approximated and which as such exist thruout the various stages of the nuclear cycle including interphase. This conception enables the formation of a consecutive history of the chromosome which so far fits the observed facts and the genetic scheme (Nebel and Ruttle, 1936). Tight pachytene pairing in *Tradescantia* seems to be confined to intermittent regions of the chromosome. In barley and rye as in corn (McClintock, 1933) and onion (Emsweller and Jones, 1935) synapsis is close throughout the length of the homologues and of considerable duration. The number of threads per chromosome appears to be essentially the same in barley, rye and *Tradescantia*. It would seem that in these plants closeness of the pairing is in no way attributable to the number of threads present in a chromosome prior to synapsis.

Summary

The somatic chromosome of rye, barley and crocus at all stages of mitosis is of an essentially quadruplicate structure. Four discrete threads per chromosome arranged in pairs were observed at late anaphase, telophase and during prophase.

There are also four threads per chromosome in rye and barley during the last pre-meiotic telophase. Doubleness of the interphase, preleptotene and very early leptotene thread was quite evident. The "apparent singleness" of the later leptotene thread is the result of the very close re-association of the half-chromatids and chromatids. Each homologue of the earliest pachytene bivalents observed showed two chromatids per chromosome. In diplotene and diakinesis the four-partite structure of each chromosome was again observed.

The interkinesis dyad chromosome was clearly eight-partite suggesting that as in *Tradescantia* the chromosome from first to second metaphase is an eight-partite structure. At second anaphase by the division of the chromosome at second metaphase the number of threads is again four, this number being clearly observed at late second anaphase and early second telophase.

Acknowledgment

The present study was carried out under a grant from the Rockefeller foundation to the New York Agricultural Experiment Station. The authors are indebted to Dr. F. Schrader for advice and criticism and also for the reading of the manuscript.

Literature Cited

- Belling, J. 1933. Crossing over and gene rearrangement in flowering plants. *Genetics* 18: 388-413.
- Bonnevie, K. 1908. Chromosomenstudien I. *Arch. f. Zellf.* 1: 450-514.
- Darlington, C. D. 1931. Meiosis. *Biol. Review* 6: 223-264.
- 1935. The internal mechanics of the chromosomes. I. II. III. *Proc. Roy. Soc.* 118: 33-96.
- Dehorne, A. 1917. Recherches sur la division de la cellule I. *Arch. f. Zellf.* 6: 611-639.
- Digby, L. 1919. On the archesporial and meiotic mitoses of *Osmunda*. *Ann. Bot.* 33: 135-172.
- Emsweller, S. L. and Jones, H. A. 1935. Meiosis in *Allium fistulosum*, *Allium cepa* and their hybrid. *Hilgardia* 9: 277-288.
- Geitler, L. 1935. Der Spiralbau somatischer Chromosomen. *Zeits. f. Zellf. mikr. Anat.* 23: 514-521.
- Goodspeed, T. H., Uber, F. M. and Avery, P. 1935. Application of the Altmann freezing-drying technique to plant cytology. III. Chromosome structure in *Lilium longiflorum*. *Univ. Cal. Publ. Bot.* 18: 33-44.
- Grégoire, V. 1907. La formation des gemini hétérotypiques dans les végétaux. *La Cellule* 14: 369-420.
- Hoare, G. 1934. A comparative study of the chromosomes of *Scilla nonscripta* during somatic mitosis. *La Cellule* 43: 7-38.
- Huskins, C. L. 1932. Factors affecting chromosome structure and pairing. *Trans. Roy. Soc. Can. Sect. V*: 1-12.

- Huskins, C. L. and Smith, S. G. 1934. Chromosome division and pairing in *Fritillaria meleagris*: The mechanism of meiosis. Jour. Genet. 28: 397-406.
- and — 1935. Meiotic chromosome structure in *Trillium erectum* L. Ann. Bot. 49: 119-150.
- Kuwada, Y. and Nakamura, T. 1935. Behavior of chromonemata in mitosis VI. Metaphasic and anaphasic longitudinal split of chromosomes in the homotype division in pollen mother cells in *Tradescantia reflexa*. Cytologia, 6: 314-319.
- Kaufmann, B. 1926. Chromosome structure in its relation to the chromosome cycle I and II. Amer. J. Bot. 13: 59-80, 355-363.
- 1931. Chromonemata in somatic and meiotic mitoses. Amer. Nat. 65: 280-283.
- Lorbeer, G. 1934. Die Zytologie der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung allgemeiner Chromosomenfragen. I. Jahrb. f. wiss. Bot. 80: 564-816.
- Lundegårdh, H. 1912. Das Caryotin im Ruhekern und sein Verhalten bei der Bildung und Auflösung der Chromosomen. Arch. f. Zellf. 9: 205-330.
- Makino, S. 1936. The spiral structure of chromosomes in the meiotic divisions of *Podisma* (Orthoptera). Jour. Fac. Sc., Imp. Univ. Hok. Ser. VI. 5: 29-40.
- Marshak, A. G. 1936. Chromosome structure in meiosis and microsporocyte division of *Gasteria*. Am. Nat. 70: 56.
- McClintock, B. 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. Zeit. f. Zellf. mikr. Anat. 19: 191-237.
- 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleole in *Zea mays*. Zeits. f. Zellf. mikro. Anat. 21: 294-328.
- McClung, C. E. 1927. Synapsis and related phenomenon in *Mecostethus* and *Leptysma* (Orthoptera). Journ. Morph. and Physiol. 43: 181-265.
- Merriman, M. L. 1904. Vegetative cell division in *Allium*. Bot. Gaz. 37: 178-207.
- Nebel, B. R. 1932. Chromosome structure in *Tradescantia* I. Methods and Morphology. Zeits. f. Zellf. mikr. Anat. 16: 251-284.
- 1933a. Chromosome structure in *Tradescantia* IV. The history of the chromonemata in mitosis of *Tradescantia reflexa* Raf. Cytologia 5: 1-14.
- 1933b. Chromosome structure in *Tradescantia* V. Optical analysis of a somatic telophase chromosome. N.Y. Agr. Exp. Sta., Tech. Bull. 220.
- 1935. Chromosomenstruktur VI. Ein Ausschnitt. Der Züchter 5: 132-136, 155.
- and Ruttle, M. L. 1936. Chromosome structure IX. *Tradescantia reflexa* Raf. and *Trillium erectum* L. Amer. Jour. Bot. 23: 652-663.
- 1937. Chromosome structure XIII. *Dioscorea carolina* L. Zeit. f. Zellf. mikr. Anat. in press.
- Overton, J. B. 1921. The organization of the nuclei in the root tip of *Podophyllum peltatum*. Trans. Wis. Ac. Sc. 20: 275-322.
- Robertson, W. R. B. 1916. Chromosome studies I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of *Tettigidae* and *Acrididae*, *Locustidae* and *Gryllidae*: Chromosomes and variation. Journ. Morph. and Physiol. 27: 179-332.
- 1931. Chromosome studies II. Synapsis in the *Tettigidae* with special reference to the presynapsis split. Jour. Morph. and Physiol. 51: 119-146.
- Sax, K. and Anderson, E. 1934. Interlocking of bivalent chromosomes in *Tradescantia*. Genetics 19: 157-166.
- Sax, K. 1930. Chromosome structure and the mechanism of crossing over. Journ. Arn. Arb. 11: 193-220.
- 1935. Variation in chiasma frequencies in *Secale*, *Vicia* and *Tradescantia*. Cytologia 6: 289-293.
- Sax, H. J. and Sax, K. 1935. Chromosome structure and behavior in mitosis and meiosis. Jour. Arn. Arb. 16: 423-439.
- Sharp, L. W. 1920. Somatic chromosomes in *Tradescantia*. Am. Jour. Bot. 7: 341-354.
- 1929. Structure of large somatic chromosomes. Bot. Gaz. 88: 349-382.
- Stebbins, G. L. 1935. Chromosome structure and the mechanism of meiosis in plants. Am. Nat. 69: 81.
- Taylor, W. R. 1922. Organization of heterotypic chromosomes. Sc. 56: 635.

On the Influence of Oxygen Supply upon the Division and Elongation of Cells in the Root ¹⁾

By

Hitoshi Kojima

The necessity of an oxygen supply for the normal growth of tissues of aerobic plants is generally known and a number of investigations concerning this subject have already been made (cf. Clements 1921). But the researches analysing the relation between the oxygen supply and the growth in its cytological aspect are rather rare. The present investigations were undertaken to supply the shortage of knowledge in this field, as a research connected with cyto-physiological investigations upon the growth of roots upon which the writer has hitherto continuously been engaged (Kojima 1928, 1931, 1933).

I

The material *Vicia Faba* was used, because it was relatively easy to obtain a plentiful supply of uniform individuals and because the writer had used the same material several times hitherto and was therefore familiar with its nature.

The root of land plants, generally speaking, can not live long in water without aeration (Bergman 1920, Lehmann 1911; also cf. Arker 1901, Hall, Brenchley and Underwood 1913). But the influence of oxygen is related to other factors such as temperature, humidity, medium and others (Cannon 1915, 1923, 1925, Lehmann 1911); and there is especially a wide difference of oxygen requirement according to the kind of plants (Wieler 1881, Livingston and Free 1917, Zimmerman 1930). In order to examine whether the material is really suitable for the present purpose the writer tried macroscopically a physiological preliminary study regarding the influence of oxygen supply upon the elongation of the root at the first place.

Seedlings germinated and grown in saw-dust, having roots of nearly the same length, were divided into four lots, and were set vertically in four glasscylinders, containing a culture medium. The portion of the root below a point ca. 2.5 cm. from the cotyledon was allowed to be submerged in the medium. As the culture medium 0.1% Knop's solution²⁾ was used; the solution was boiled for one

1) Contributions from the Botanical Laboratory, Kyushu Imperial University, No. 63.

2) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4.0 gr., MgSO_4 1.0 gr., KNO_3 1.0 gr., KH_2PO_4 1.0 gr. and distilled water 7000 c.c., without FeCl_3 .

hour, and then quickly cooled, thus the gases which were dissolved in the solution were excluded as far as possible. The first cylinder was bubbled constantly throughout the experiment with the air from which oxygen was excluded by means of pyrogallol solution¹⁾ through a small pore situated near at the bottom of the cylinder. The second cylinder was left entirely non-aerated. The third cylinder was aerated by bubbling with normal air in the same way as the first cylinder. The fourth cylinder was similarly bubbled but with pure oxygen. Thus four different conditions of oxygen supply were examined. After the seedlings were placed in the four culture solutions, liquid paraffin was poured gently in each cylinder, to form a layer of ca. 1.5 c.m. thickness over the surface of solution in order to prevent the

Table 1. Elongation of root. Given number for each lot represents the average of ten roots

Experiment	Lot	Root length at the end of experiment (in mm.)	Elongation of the root during 24 hours	
			Real number (in mm.)	Relative value
I (June 3-4, 1936) Temperature: 20.5-21.0°C	I	78.6	20.0	81
	II	84.0	24.7	100
	III	89.6	31.2	126
	IV	92.1	33.5	136
II (June 10-11, 1936) Temperature: 20.6-22.9°C	I	81.3	21.1	95
	II	81.9	22.2	100
	III	95.1	35.0	158
	IV	94.4	34.1	154
III (June 17-18, 1936) Temperature: 23.5-26.5°C	I	109.3	17.0	90
	II	111.8	18.9	100
	III	125.0	30.8	163
	IV	133.8	40.9	216
Average results of the 3 experi- ments	I		19.4	89
	II		21.9	100
	III		32.3	147
	IV		36.2	165

absorption of gas from the air into the solution. All the four cylinders were kept in a dark-room for 24 hours. The temperature of the media was occasionally recorded. Of course the temperature varied according to the difference of the time of the experiments; but the variation of the temperature between the different cylinders in one and the same experiment was always very small (the maximum of variation was 0.4°C).²⁾

1) Pyrogallol dissolved in NaOH-solution was poured in a bottle of ca. 20 l. up to ca. 1/5 its volume. Shaking the bottle occasionally we left it for more than 3 days. When the pressure of the inside of the bottle was diminished, because of dissolving the oxygen in the solution, diluted solution of pyrogallol was sucked into the bottle through a glass tube, so that the negative pressure in the bottle was replaced.

2) All the gases, which were introduced into the media, were prepared at the same temperature as the outside air.

Measuring the total length of the root (from the insertion of the cotyledon down to the root apex) at the beginning of the experiment as well as after 24 hours, we found the total elongation of the root during the period of time. The results are given in Table 1.

From these experiments we were able to ascertain, as had been expected, that with the increase of the oxygen supply in the medium, the elongation of the root became greater.

II

As the material for cytological observation, the seedlings used in Experiment I were employed. After measuring the elongation of the roots, they were fixed in Flemming's weaker solution.¹⁾ Paraffin sections of 10μ , parallel to the long axis of the root were made, and stained in Heidenhain's iron haematoxylin. Five of those sections, passing as near as possible to the central axis of the root were observed.²⁾ The number of mitotic figures was counted and the frequency of cell division $\left(\frac{N}{A}(\%) \right)^{3)}$ was calculated. The results thus found are given in Table 2.

Table 2. Frequency of cell division

Lot	No. of roots observed	No. of sections observed	Total no. of mitotic figures observed	Average of the frequency of cell division $\left(\frac{N}{A}\right)$	
				Real no. (in %)	Relative value
I	10	50	3847	46.7	94
II	10	50	4062	49.5	100
III	10	50	4622	59.2	120
IV	10	50	5827	75.7	153

Namely, the frequency of cell division in the lot bubbled with pure oxygen is largest; that in the lot aerated with normal air is next. The frequency of cell division in the lots which are not supplied with oxygen is small.

The length of cells in the outer part of the cortex of the root, on the same sections above mentioned, at points respectively 1, 3, 5, 10 and 15 mm. from the root apex, was measured. The results are seen in Table 3.

1) 1% chromic acid 25 c.c. + 1% glacial acetic acid 10 c.c. + water 55 c.c. + 1% osmic acid 10 c.c.

2) Zeiss' microscope AA or DD \times K8 and ocular micrometer $\frac{100}{100}$ mm. were used.

3) N is the total number of mitotic figures found on the five sections of root tip within the space of 3 mm. from the root apex; A is the relative value of the area examined—namely, the sum of the numbers indicating the diameters measured on the five sections at distances of respectively 1, 2 and 3 mm. from the root apex (cf. Kojima 1931, p. 123).

Table 3. Length of cell

Lot	No. of roots observed	No. of sections observed	Average cell length at the points respectively from the root apex					
			1 mm.	3 mm.	5 mm.	10 mm.	15 mm.	
							Observed no.	Relative value
I	10	50	4.7 ¹⁾ (496) ²⁾	9.0(492)	22.2(443)	38.9(375)	42.2(362)	99
II	10	50	4.4 (500)	8.4(488)	19.5(410)	33.1(334)	42.5(287)	100
III	10	50	4.8 (500)	7.5(504)	18.2(468)	42.7(364)	51.4(311)	121
IV	10	50	4.6 (502)	8.1(499)	19.5(448)	41.2(289)	51.8(250)	122

1) The real value in μ is obtained by multiplying by $\frac{18}{5}$.

2) The total number of observed cells is given in brackets.

As a matter of course, there was no remarkable difference among the lots in the real number of the length of cells which were situated near the root apex; but at the points 10 or 15 mm. from the root apex, the length of cells of the lots to which oxygen was supplied was evidently larger than that of the lots to which oxygen was not supplied.

III

Essentially, oxygen is necessary for the oxidation of food material, and the greater part of the energy of cell activity is probably due to it. Hence, in general, cell activity, for instance the streaming of protoplasm, is reduced by the scarcity of oxygen, as has already been pointed out by Hauptfleisch (1892), Samassa (1900) and others. The fact that the perception of a stimulus is suppressed in the absence of oxygen was also investigated by Wortmann (1884), Paal (1912), Van Ameijden (1917) and others. Sabline (1903) found a considerable number of mitotic figures in the root tip of *Vicia Faba* deprived of oxygen for a period of 2 hours; but he noted that the figures were more or less modified, chiefly by the absence of the formation of a cell-plate and the faintness of the spindle. Investigating young seedlings of *Helianthus annuus*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris* in an oxygenless atmosphere O. Nabokich (1904) observed that, though there was some discrepancy in duration of time according to the kind of plant, sooner or later the mitotic figures disappeared. A. Nabokich (1909) subjecting the shoot of *Pisum* to an oxygen free medium for 5½ hours, found all the stages of mitosis, just as control shoots, but he could find nuclei only in resting-stage in the shoot which was exposed for 50 hours in that medium.

In the present investigation the mitotic figures were seen to be nearly normal in the root which had not been supplied with oxygen during 24 hours, though the frequency of the cell division was smaller than that of the root supplied with oxygen. O. Nabokich (1904) concluded that the cell division is independent of the presence of

oxygen and that the injuring observed is due to secondary factors; in our case, nevertheless, we cannot think that the smallness of the frequency of cell division in the root grown without oxygen supply is not attributable to the (direct) influence of the lack of oxygen. It is noticeable, however, that comparing the root aerated with pure oxygen to that aerated with normal air, the frequency of cell division in the former is larger than that in the latter. Granting that there is no difference in the influence of oxygen between these two culture media, the medium bubbled with ordinary air would receive, besides oxygen, other gases, namely, hydrogen, nitrogen and carbon dioxide—the latter, especially, is thought to be injurious to plant cells and to stop nuclear division¹⁾—and thus, the frequency of cell division may possibly be reduced as a result of presence of those gases.

A question may be raised concerning the root, submerged in the medium without oxygen supply during 24 hours, and which yet shows a fairly high rate of cell division, namely, whether it is merely an “anaërobic” division, as A. Nabokich (1909) stated, or is caused by the supply of oxygen transported from the aerial part of the plant down to the root tip.

With regard to the elongation of cells, as Table 3 shows, a noticeable difference is seen between the root supplied with oxygen and that denied it, particularly at a point 15 mm. from the root apex. Probably the length of cells at this point indicates the length of adult cells (i.e. the maximum cell length). Thus in this study we may conclude that the lack of oxygen supply retards the elongation of cells. Palladin (1886) stated that lack of oxygen must reduce the production of substances which cause turgor; Kny (1889) found that shortage of oxygen content, even though the degree is not sufficient to kill the cell completely, is enough to prevent the formation of cell-walls. Van Ameijden (1917) noted that when seedlings, which have previously received geotropic or heliotropic stimuli in the air, are placed in an oxygen-free atmosphere, they are unable to react. As the geotropic or heliotropic reaction is caused by the disparity in elongation of the cells at the stimulated portion, his investigation also shows that the elongation of cells is hindered in an oxygenless atmosphere. When these conclusions are considered together, the result of the present study, namely, that the elongation of cells in oxygen-free medium (or in medium having minute content of oxygen) is small, seems reasonable.

Comparing the degree of the elongation of the root with the frequency of cell division, as well as with the degree of the elongation

1) cf. Lopriore 1895, Lehman and Andrews 1934.

of cell (Table 4), we may probably conclude with good reason that, though the difference in the elongation of roots treated with the different conditions of oxygen supply, in this case, is attributable both to the difference in the rate of frequency of cell division and to that in the degree of the elongation of cell, in point of fact the former factor seems to play a more important rôle than the latter.

Table 4. Comparison of relative values of the elongation of root, the frequency of cell division and the length of cells

Lot	Elongation of root	Frequency of cell division	Length of cells
I	89	94	99
II	100	100	100
III	147	120	121
IV	165	153	122

This investigation was supported by a grant from the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan, to which Foundation the writer's thanks are due. Also he wishes to acknowledge his indebtedness and express his gratitude to Professor Dr. R. Kôketsu for his helpful criticism and advice throughout the progress of the work.

Summary

1. In this experiment it was, in the first place, ascertained, as had been expected, that the elongation of the root of *Vicia Faba*-seedlings, cultivated in culture solution, was remarkably influenced by the degree of the oxygen supply.

2. We were able to make sure that the degree of the elongation of root, which was increased when the oxygen supply was rich and decreased when no oxygen was supplied, was accompanied by the increase and the decrease of the frequency of cell division respectively.

3. It was also seen that the elongation of individual cells likewise varied with the elongation of the root.

4. Though the degree of the elongation of the root differs with both the frequency of division and the elongation of individual cells, the former may likely have more important effect upon it, in this case, than the latter.

Literature cited

- Ameijden, U. P. van, 1917. Geotropismus und Phototropismus unter Abwesenheit freien Sauerstoffes. Diss. Utrecht, pp. 76; cit. in Clements, 1921.
- Arker, J., 1901. Die Beeinflussung des Wachstums der Wurzeln durch das umgebende Medium. Diss. Erlangen, pp. 76; Bot. Centralb., 87: 433-434, 1901.
- Bergman, H. F., 1920. The relation of aeration to the growth and activity of roots and its influence on the ecesis of plants in swamps. Ann. Bot., 34: 13-33.
- Cannon, W. A., 1915. On the relation of root growth and development to the temperature and aeration of the soil. Amer. Jour. Bot., 2: 211-224.
- , 1923. The influence of the temperature of the soil on the relation of roots to oxygen. Science, n.s., 58: 331-332.

- Cannon, W. A., 1925. Physiological features of roots with special reference to the relation of roots to aeration of the soil. Carnegie Inst. Washington, Publ. 368; cit. in Zimmerman, 1930.
- Clements, F. E., 1921. Aeration and air-content, the rôle of oxygen in root activity. pp. 183, Carnegie Inst. Washington, Publ. 315.
- Hall, A. D., W. E. Brenchley and L. M. Underwood, 1913. The soil solution and the mineral constituents of the soil. Phil. Trans. Roy. Soc. London, B., 204: 179-200; cit. in Clements. 1921.
- Hauptfleisch, P., 1892. Untersuchungen über die Strömung des Protoplasmas in behäuteten Zellen. Jahrb. Wiss. Bot., 24: 173-234.
- Kny, L., 1889. Über die Bildung des Wundperiderms an Knollen in ihrer Abhängigkeit von äußeren Einflüssen. Ber. D. Bot. Ges., 7: 154-168.
- Kojima, H., 1928. On the relation between cell division and elongation in the root of *Vicia Faba*. Jour. Dept. Agric., Kyushu Imp. Univ., 2: 75-91.
- , 1931. Division, growth and differentiation of cells in the root of *Vicia Faba* artificially inhibited from further elongation. Ibid., 3: 121-147.
- , 1933. Cell division and elongation in the decapitated root of *Vicia Faba* L. Ibid., 3: 269-301.
- Lehman, B., and F. M. Andrews, 1934. Nuclear division in *Tradescantia virginiana*. Plant Physiol., 9: 845-849.
- Lehmann, E., 1911. Zur Kenntnis des anaeroben Wachstums höherer Pflanzen. Jahrb. Wiss. Bot., 49: 61-90.
- Livingston, B. E., and E. E. Free, 1917. The effect of deficient soil oxygen on the roots of higher plants. Johns Hopkins Univ. Circ., n.s., 3: 182-185; cit. in Zimmerman, 1930.
- Lopriore, G., 1895. Über die Einwirkung der Kohlensäure auf das Protoplasma der lebenden Pflanzenzelle. Jahrb. Wiss. Bot., 28: 531-626.
- Nabokich, A. J., 1909. Temporäre Anaërobiose höhere Pflanzen. Landw. Jahrb., 38: 51-194; Zeitsch. Bot., 1: 731-734, 1909.
- Nabokich, O., 1904. Über anaërobe Zellteilung. Ber. D. Bot. Ges., 22: 62-64.
- Paal, A., 1912. Analyse des geotropischen Reizvorgangs mittelst Luftverdünnung. Jahrb. Wiss. Bot., 50: 1-20.
- Palladin, W., 1886. Atmung und Wachstum. Ber. D. Bot. Ges., 4: 322-328.
- Sabline, M. V., 1903. L'influence des agents externes sur la division des noyaux dans les racines de *Vicia faba*. Rev. gén. Bot., 15: 481-498; Bot. Centralb., 96: 212-213, 1904.
- Samassa, P., 1900. Über die Einwirkung von Gasen auf die Protoplasmaströmung und Zellteilung von *Tradescantia*, sowie auf die Embryonalentwicklung von *Rana* und *Ascaris*. Verh. Natur. Ver. Heidelberg, 4: 1; Bot. Centralb., 84: 320-321, 1900.
- Wieler, A., 1881. Die Beeinflussung des Wachstums durch verminderte Partiärpressung des Sauerstoffs. Unters. Bot. Inst. Tübingen, 1: 189-232.
- Wortmann, J., 1884. Studien über geotropische Nachwirkungserscheinungen. Bot. Ztg., 45: 705-713; Bot. Jahresb., 12: 38, 1884.
- Zimmerman, P. W., 1930. Oxygen requirements for root growth of cuttings in water. Amer. Jour. Bot., 17: 842-861.

Alternation of Generation

By

Charles Joseph Chamberlain

Professor Emeritus of Botany in the University of Chicago

Studies of life histories had not progressed very far before it was noticed that in many plants there are two phases in the cycle, each with its own characteristics. Nowhere in the plant kingdom is this more evident than in the fern, where the prothallium, with its archegonia and antheridia, produces eggs and sperms, a sperm fertilizes an egg, and the fertilized egg grows into the familiar fern plant which finally produces sporangia containing spores. A germinating spore develops into a prothallium and thus the two phases alternate. Each generation is easy to recognize because it is a green independent individual.

Theories in regard to alternation arose and discussion became intense. Presidents of the British Association for the Advancement of Science devoted their addresses to this subject and wherever there was any interest in morphology, evolution, and phylogeny the relative merits of antithetic and homologous alternation were discussed. After a while the discussion subsided and many of us believed that the theory of homologous alternation had died of increasing knowledge. But EAMES, in his recent textbook, *Morphology of Vascular Plants*, attempts to revive the homologous theory; and the famous Bonn Textbook, while it does not support the theory, presents some interpretations with which we cannot agree. Consequently, it seems worth while to present the case of antithetic alternation as we understand it, laying the principal stress upon the origin of the phenomenon.

It is only a little over 100 years ago since ROBERT BROWN (1831) discovered the nucleus, and less than 100 years since it became recognized as a constant organ of the cell. As investigation of the nucleus advanced and details of its structure became known, it was evident that the nuclei of the two generations differed constantly in the number of their chromosomes, the nuclei of the familiar fern plant having twice as many as those of the prothallium. Studies of spermatogenesis, oogenesis, fertilization and early embryogeny proved that the number of chromosomes in the sperm and in the egg is just half that which is revealed at the first mitosis of the fertilized egg. Similarly, in isogamous plants, the number at the first mitosis of the zygote is the sum of the numbers found in the two gametes.

We firmly believe that this x and $2x$ condition in the number of chromosomes is not merely incidental: it marks a forward step in the evolution of plants, the beginning of Alternation of Generations. The fertilized egg, or in isogamy, the zygote, is the first cell of a new generation. It is universally recognized that, from the bryophytes to the orchids, the fertilized egg is the first cell of the $2x$ generation, usually called the sporophyte, because it comes to an end with a reduction in the number of chromosomes, resulting in the formation of spores, each of which has the x number. The spore¹⁾ is the first cell of the x generation, usually called the gametophyte, because, sooner or later, it produces gametes.

This alternation of spore producing and gamete producing generations is so evident from the liverworts to the highest seed plants that every botanist recognizes it, and the terms sporophyte and gametophyte are appropriate.

Below the level of sexuality, in all of the Cyanophyceae, in some Chlorophyceae, and in some fungi, there being no gametes, there is only one generation. In these low forms, where there is any differentiation of the chromatin into chromosomes, we should regard the number as an x number, but the plant could not be called a gametophyte, because it does not produce gametes. We assume that sexuality is higher in the scale of evolution than the asexual condition and, in phylogeny, arose from it.

With sexuality once established, two generations, in our opinion, are necessarily present. At first, as in *Spirogyra* and many other thallophytes, the $2x$ generation is very short, reduction of chromosomes taking place at the germination of the zygote. But even in *Spirogyra*, the four nuclei formed at the reduction of chromosomes in the zygote might be regarded as the nuclei of four spores. In some species of *Mesocarpus*, the cytoplasm is separated into four masses which become surrounded by spore coats, so that the older taxonomists called the structure a "sporocarp." Only one of the four spores is functional, three being small and abortive. It looks like a step in advance of the condition in *Spirogyra*, with its three abortive nuclei and one functional nucleus.

When reduction of chromosomes takes place at the germination of the zygote, no $2x$ generation, except the zygote, is built up, and some botanists claim that no $2x$ generation is present. But a $2x$ generation has been initiated and, from this beginning, the study of

1) We recognize that the carpospore of *Polysiphonia* and similar forms, and also the aeciospore, urediniospore and early stages of the teliospore in the Basidiomycetes are $2x$ structures. In these forms, the only spores, in the sense in which we are using the term, are the tetraspores and basidiospores.

alternation is largely a study of the evolution of the new generation. Considerable complexity and, in some cases, a great increase in size, is reached in the algae; but the greatest development in complexity and in size came in the descendants of those algae which adopted a land habitat.

In the liverwort, *Riccia*, reduction of chromosomes is delayed, there being several mitoses between fusion of gametes and reduction of chromosomes. The result is a small but easily recognizable $2x$ body, which is very simple, consisting entirely of spores, except the outer sterile protective layer of cells. Somewhere in the algae we might hope to find conditions intermediate between *Spirogyra* and *Riccia*, perhaps in *Coleochaete*. In *Coleochaete scutata* reduction takes place at the germination of the zygote, as in *Spirogyra*. But there is at least one more mitosis before spores are formed. The 8-celled body produces spores and, from its function, might be called a sporophyte; but, to avoid confusion, this name should be reserved for $2x$ plants which produce spores. Similarly, there are $2x$ plants which produce gametes. It simply means that the terms gametophyte and sporophyte, as applied in the higher plants, are not always synonymous with x and $2x$ generations, the latter pair of terms being broader.

The 8-celled x spore producing body in *Coleochaete* has a form very different from that of the x gamete producing body, and its form suggests that it might be the forerunner of such a $2x$ body as is found in *Riccia*. If reduction of chromosomes should be delayed, a body much like that in *Riccia* would be formed. Where does reduction take place in other species of *Coleochaete* where the body developed from the zygote contains 16, 32 or even 64 cells? On the other hand, some simple aquatic tropical liverwort might bridge the gap. Prof. BARNES and Prof. LAND found more than 20 new species of liverworts and mosses, including three new genera, in one week, within a days walk from their hotel near the volcano, Colima, in Mexico. They were not collecting algae. Consequently, the suggestion that forms may still be found to bridge the gap is not entirely visionary.

The evolution of alternation of generations is marked by an increasing number of mitoses between the fusion of gametes and the reduction of chromosomes. In general, with the increasing interval between fusion and reduction, a larger $2x$ body is built up, with increasing differentiation. In *Riccia* almost all of the $2x$ body produces spores; in *Marchantia*, spores are formed only in the products of the epibasal cell and even here there is a sterile protective layer on the outside, and much of the sporogenous tissue develops into elaters. In *Anthoceros* there is, in addition, a columella, and in some of the

order the "elaters" form a plate between the spore masses, a condition which might develop into leaves. However, a definitely leafy 2x generation has not yet been found below the pteridophytes. It may be that the first leafy 2x plants were such pteridophytes as some of the Psilophytales. Much of the differentiation of the 2x body, as it appears in the bryophytes and pteridophytes, has been described by BOWER in his theory of progressive sterilization of sporogenous tissue, a theory which he has established so thoroughly that many of us regard it as a fact.

The 2x generation, in its simplest form, is merely a zygote which, in its first two mitoses, produces four spores, as in *Spirogyra*, where the spores are represented only by nuclei with surrounding cytoplasm; in some species of *Mesocarpus*, where the four spores have spore walls, and in *Oedogonium*, where the four spores are motile. In *Riccia* there are a few mitoses after the fusion of gametes, with a differentiation into sporogenous and sterile tissue, before spores are formed. And in the further evolution of the 2x phase, the sporogenous tissue is more and more restricted and comes later and later in the life history. Some cycads reach an age of 30 years and have leaves 3 meters long before any sporogenous tissue appears. In *Nereocystis* the sporophyte often reaches a length of 30 meters before spores are formed.

As the 2x phase develops, the x phase becomes more and more reduced, until, in the angiosperms, it would not be recognized as the descendant of an originally green independent plant, were it not for its place in the evolutionary series.

While the two phases alternate so definitely, their forms present infinite variety. In *Dictyota*, the two generations are of the same size, look alike, and the x phase is dioecious. In *Cutleria*, the two phases look different, with the x generation like a delicate *Fucus* and dioecious, while the 2x looks like a large *Peziza*. In the nearly related *Zanardinia*, both generations look like large *Pezizas*, and the x phase is monoecious. In some of the brown algae, like *Nereocystis*, with its 2x phase, more than 30 meters in length, the x phase is so small that it has never been found except in cultures. In the red alga, *Polysiphonia*, in the vegetative condition, the two phases look alike and the x phase is dioecious. A separation of the two phases, except on an x and 2x basis, seems impossible; for after fusion of gametes in the carpogonium, the fusion nucleus slips down into a large cell formed by the union of auxiliary cells and, in this large cell, the fusion nucleus divides repeatedly; parts of the wall of the big cell bulge up and each bulge receives a 2x nucleus, becoming a carpospore which germinates into a 2x plant. Some cells of the 2x plant

finally undergo reduction and produce spores with the x number of chromosomes. These spores germinate into antheridial and carpogonial plants. In the big cell of the cystocarp, some nuclei of auxiliary cells may divide, showing the x number of chromosomes; while other nuclei, resulting from the fusion in the carpogonium, divide and show the $2x$ number. This fusion cell, with both kinds of nuclei and also the wall of the cystocarp, one layer of which is of x cells derived from the female plant and the other layer of $2x$ cells, resulting from fertilization, would be hard to place in either generation, except on an x and $2x$ basis.

Even among those who accept the x and $2x$ basis for separating the two generations, there is sometimes a difference of opinion as to the limits of the generations. *Puccinia graminis* will illustrate. A binucleate phase appears in the aecium, continues in the mycelium derived from the aeciospore and in the urediniospores and in the young teliospores, the two nuclei fusing in the older teliospore. Some would contend that the $2x$ phase begins with this fusion in the teliospore. We believe it begins with the binucleate condition in the aeciospore. Even in *Pinus*, the gamete nuclei are in the spirem stage, or later, before they become included within one nuclear membrane. In *Lilium* the independence is about the same; and, if the chromosome is an independent organ, there is never any loss of identity. As far as any theory is concerned, it hardly seems to matter whether each nucleus keeps its own membrane or the two chromatins become surrounded by a single membrane.

It is only in the thallophytes that cases may be found in which the two generations are entirely independent of each other, as in *Cutleria*, *Zanardinia*, *Dictyota*, and *Nereocystis*. There are many cases in which the $2x$ phase is more or less parasitic on the x generation. In the mosses, the $2x$ phase is parasitic on the x phase throughout its entire life. In the pteridophytes the $2x$ phase is parasitic only during early embryogeny. In the gymnosperms, the parasitic period is still further reduced and in some angiosperms, notably the orchids, the parasitic condition of the $2x$ stage consists of only a few cells with no differentiation into regions.

On the other hand, the x generation, with the appearance of heterospory, becomes parasitic and more and more reduced as the seed stage is reached. In heterospory, the x generation is necessarily dioecious. In the conifers—to mention only the female line—the x generation, entirely confined within the spore coat, consists of thousands of cells and produces archegonia which are only a little more reduced than those of the pteridophytes. But in the Gnetales, the reduction has gone much further until, in *Gnetum*, cells are

formed only at the antipodal end of the gametophyte, the micropylar end remaining in the free nuclear condition until fertilization has taken place. In the angiosperms reduction has gone still further, so that in most cases there is only an 8-nucleate structure, bearing no resemblance to a green independent individual. It looks more like an integral part of the host generation, and would be so interpreted were it not for its place in the evolutionary series. The limit of this reduction is seen in *Plumbagella*, where there are only four of the x nuclei, one of which is the egg nucleus.

Thus there are cases in which both generations are independent throughout the life history; cases in which the x generation is independent throughout the life history, and cases in which it is dependent throughout the entire history; cases in which the 2x generation is independent throughout, and cases in which it is parasitic throughout its whole life. And between these extremes, there are all possible gradations, with the x or 2x generation parasitic on the other during a greater or lesser part of its development.

Alternation was recognized and described before names were given to types which seemed to be different. A mistaken view of the life history of *Vaucheria* and similar forms led CELAKOVSKI to propose the term *homologous alternation* for this type, while alternation, as it appears in the fern, was named *antithetic*. In *Vaucheria*, for example, it was assumed that the fertilized egg gave rise only to individuals which produced spores, while the spore gave rise only to plants which produced gametes. Since the two individuals looked alike, the name, homologous alternation, seemed appropriate. However, KLEBS proved that there is no such differentiation in individuals. On the contrary, plants from spores can be made to produce either gametes or spores; and plants from fertilized eggs may produce not only spores, but also gametes. All of the filaments are x plants, reduction taking place at the germination of the zygote. But the chromosome condition was not known when the terms were introduced. Disregarding the cytological feature, those who favor homologous alternation would extend it to forms like *Dictyota*, *Poly-siphonia*, and *Zanardinia*; but they might hesitate at *Cutleria*.

Some even claim homologous alternation in the fern, since an alternation of prothallium and leafy plant may occur without fertilization or any change in chromosome numbers. Apogamy and apospory are well known throughout the plant kingdom and in many cases the cytological condition has been determined. However, we should regard these cases as deviations from the normal course of the life history, and consequently they would have no bearing upon a theory of alternation. One could scarcely look at the cytology of *Taraxacum*

without being convinced that it originally had normal fertilization, and that its apogamy is a derived condition.

In short, we believe that alternation of generations arose from the fusion of gametes, with a doubling of the number of chromosomes, so that there is an alternation of x and $2x$ phases in the life history. With the appearance of the $2x$ phase, whether it be long or short, alternation has begun, and from this beginning there is an increasing dominance of the $2x$ phase, and, in the higher forms, a progressive reduction of the x generation.

Speculation as to what the prothallium might be in the Psilophytales has no bearing upon the theory of antithetic versus homologous alternation. The tuberous prothallia of *Psilotum* and *Tmesipteris*, and of most species of *Lycopodium* are derivatives of green independent prothallia like those of *Lycopodium cernuum* and several other species. *Phylloglossum* shows an interesting condition intermediate between an entirely green independent prothallium and the subterranean tuberous form, with a green branching part above, while a tuberous, yellowish part below contains the endophytic fungus. Some of the Devonian Psilophytales show tetrads of spores in sporangia and it is scarcely theorizing to suggest that the spores develop into prothallia with eggs and sperms. Any theory of alternation should be based upon its origin, and the Psilophytales are already too far advanced to throw any light upon this subject.

Since an alternation x and $2x$ phases occurs in animals, it might be asked whether we should claim that they also show alternation. The case in animals is no more extreme than in *Plumbagella*, where the x generation would not be recognized as an individual, except that it stands at the end of a long line in the reduction. STRASBURGER, in his classic paper on the *Periodic Reduction of Chromosomes*, suggested an alternation in animals, and it seems to be the logical conclusion as we trace the gradual reduction of the x generation in plants until it finally becomes as far reduced as in the higher animals.

Alternation of generations originates as an alternation of x and $2x$ individuals, an antithetic alternation. In our opinion, it is the only type found in plants.

Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies ¹⁾

III. Polysperme Befruchtung der Eizelle und mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle bei der künstlichen Besamung *in vitro*

Von

Jinshin Yamane

Zootechnisches Institut, Kaiserliche Universität, Taihoku, Formosa

(Mit 8 Textabbildungen und 2 Tafeln)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	583
II. Material und Methode	584
III. Einrichtung des Kanincheneies für die Monospermie bei der Befruchtung <i>in vivo</i>	585
IV. Experimente	588
A. Betrachtung einzelner Fälle	588
B. Zusammenfassende Betrachtung der Fälle	595
1. Eizelle	595
2. Erste Polzelle	598
3. Zweite Polzelle	598
V. Besprechung der Ergebnisse	599
VI. Schluß	603
VII. Literaturverzeichnis	604
VIII. Tafelerklärung	604

I. Einleitung

Daß das Tubenei des Kaninchens *in vitro* und zwar in Tyrodelösung, eine Zeit lang lebensfähig ist und künstlich befruchtet werden kann, habe ich schon mitgeteilt (YAMANE 1930). Es hat sich dabei herausgestellt, daß das Ei als Reaktion auf das Eindringen des Spermatozoon die zweite Polzelle abstößt. Die Untersuchungen damals hatten sich aber nur auf die Lebendobjekte beschränkt. Wir haben noch Schnittuntersuchungen der Eizelle in verschiedenen Befruchtungsphasen auszuführen, wenn wir das Eindringen des Spermatozoon in die Eizelle und die darauf reagierende zweite Reifungsteilung bestätigen wollen. Bei den hinsichtlich durchgeführten Schnittuntersuchungen erwies sich in ganz unerwarteter Weise, daß das *in vitro* besamte Ei im Befruchtungsvorgang vom *in vivo* befruchteten Ei sehr verschiedentlich abläuft. Der wesentliche Unterschied liegt darin, daß bei der künstlichen Besamung *in vitro* Polyspermie sowohl in der Eizelle als auch in der zweiten Polzelle überwiegend vorkommt,

1) Ausgeführt mit Unterstützung der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.

während bei der normalen Befruchtung der Eizelle *in vivo* Monospermie die allgemeine Regel ist und das Eindringen des Spermatozoon in die Polzelle überhaupt nicht auftritt.

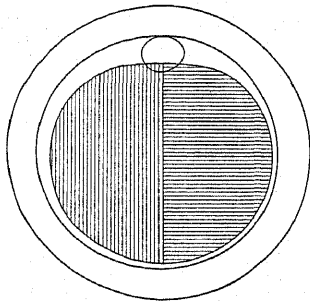
Im folgenden sollen nun diese eigenartigen Erscheinungen geschildert werden, die uns wichtige Schlüssel zur Kausalanalyse des Mechanismus der Befruchtung darbieten.

II. Material und Methode

Die Tubeneier, die den 13½ Stunden nach steriler Kopulation getöteten Tieren entnommen wurden, weshalb noch mit Follikelzellmasse und Corona radiata vollkommen ausgerüstet waren, wurden fast sogleich nach der Entnahme *in vitro* besamt. Da das ganze Verfahren von der Tötung des Tieres bis zur Entnahme der Eier etwa 30 bis 45 Minuten dauerte, geschah die Besamung beinahe 14 bis 14½ Stunden post coitum. Die Zeitspanne bis zur Fixierung schwankte je nach dem Ei.

Die im folgenden zu schildernden Eier sind ausschließlich die gleichen, die ich schon in der I. Mitteilung (1935 a) in bezug auf die Dispersion der Follikelzellen und die Ablösung der Coronazellen als Folgeerscheinungen der künstlichen Besamung beschrieben habe. Für die Technik der Gewinnung der Eier und der künstlichen Besamung *in vitro* habe ich daher auf dortige Ausführungen zu verweisen. Die Fixierung erfolgte im Gemisch nach BOUIN oder BOUIN-ALLEN. Die Dicke des Paraffinschnittes betrug vorwiegend 5 μ bisweilen 8 μ . Zur Färbung wurde die HEIDENHAINsche Eisenhämatoxylinlösung verwendet.

Es sei hier etwas über die Schnittrichtung des Eies hinzugefügt. Beim Kaninchenei, wenn es auch isolecithal ist, können wir denjenigen Punkt der Eioberfläche, woraus die erste und die zweite Polzelle nacheinander abgestoßen werden, als Eipol annehmen. Die Verbindungslinie zwischen Eipol und Eizentrum bzw. ihre Verlängerung ist demnach als Eiachse anzunehmen. Für die Feststellung der im Eiinneren vorgehenden Befruchtungserscheinungen ist nun vor allem wichtig möglichst genau axiale oder lattendinale Schnitte herzustellen (Textabb. 1). Wird das Ei gegen seine Axial- oder Äquatorialebene in sehr



Textabb. 1. Schema der Schnittrichtungen des Kanincheneies. Das Ei stellt eine Oozyte II. Ordnung mit der ersten Polzelle dar. Die Verbindungslinie zwischen Eipol und Eizentrum bzw. ihre Verlängerung (fette Linie) ist als Eiachse anzunehmen. Schraffierung auf der linken und rechten Seite von dieser Achse zeigt axiale resp. lattendinale Schnittrichtung.

schräger Richtung geschnitten, so wird die Verwertung der Präparate meistens erschwert oder sogar unmöglich gemacht. Trotz aller angewandten Mühe gelang es mir jedoch infolge der Winzigkeit des Eies¹⁾ noch nicht an einem fixiertem Objekt sein Pol bzw. seine Achse zu bestimmen, um Schnittrichtung zu kontrollieren, sodaß ich vorderhand mit zufällig gewonnenen nahezu axialen oder latti-tudinalen Schnitten befriedigen mußte.

III. Einrichtung des Kanincheneies für die Monospermie bei der Befruchtung *in vivo*

Wenn der Vorgang der normalen Befruchtung des Kanincheneies auch im Rahmen der vorliegenden Abhandlung nicht liegt, muß jedoch eine kurze Beschreibung über das Eindringen des Spermatozoon in die Eizelle vorausgeschickt werden, um die Befunde bei der künstlichen Besamung *in vitro* damit zu vergleichen.

Wie schon berichtet (YAMANE 1935 a), werden die Tubeneier, die 13½ Stunden und noch später nach fertiler Kopulation gewonnen werden, durch proteolytische Wirkungen der sie in Angriff nehmenden Spermatozoen nach und nach von der Follikelzellmasse befreit. Schon 15 Stunden post coitum ist die Eihülle ganz nackt oder höchstens mit einer kleinen Menge der Coronazellen teilweise bekleidet. Unter diesen Umständen findet man eine Menge der Spermatozoen um das Ei; sie treten nicht nur außerhalb und innerhalb der Eihülle sondern auch im perivitellinen Raum auf. Selbstverständlich befindet sich die größte Menge der Spermatozoen außerhalb der Eihülle, wobei ihre Köpfe meistens an die Eihülle anhaftet sind. Im optischen Schnitt sieht man auch die Spermatozoen, die eben die Eihülle penetrieren, obwohl sie an Zahl viel geringer sind. Dabei nehmen sie meistens eine radiäre seltens aber eine tangentielle Stellung gegen die Eihülle ein.

Leichter zu beobachten sind die Spermatozoen im perivitellinen Raum am lebenden Ei. Besonders in der Polsphäre sind sie deutlich im Schwimmen zu sehen, denn der perivitelline Raum wird an dieser Gegend durch Bildung einer oder zwei Polzellen bzw. durch Abplattung sogar Aushöhlung der Eizelle so stark erweitert, daß hier eine „Polkammer“ entsteht (Textabb. 2 u. 4). Einmal kam es vor, daß sie an die Polzellen stießen und diesen eine rollende Bewegung herbeiführten.

Die Zahl der Spermatozoen, die bei der normalen Kopulation ein Tubenei erreichen, ist freilich unter Umständen sehr schwankend; sie beträgt scheinbar kaum weniger als 10. Dafür möge die bei-

1) Der Durchmesser des Kanincheneies exklusive der Eihülle beträgt im Leben etwa 110–120 μ .

folgende tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Zahlenbestimmungen der Spermatozoen um ein Ei maßgebend sein. Es wurde nämlich an je einem fixierten Tubenei durch Verfolgung der Serienschritte (Schnittdicke 5μ) die Zahl der Spermatozoen bestimmt, die nicht nur im perivitellinen Raum sondern auch an der Oberfläche und im Inneren der Eihülle lagen. Die Zahl der Spermatozoen, die schon in den perivitellinen Raum gelangten, ist ohne weiteres als wirkliche zu betrachten, weil die Eihülle beim Einbettungsverfahren vor dem Entweichen der Spermatozoen schützt. Die Gesamtzahl der das Ei erreichten Spermatozoen muß jedoch noch mehr betragen als die hier gefundene, da bei der Fixierung sowie Einbettung nicht geringe Zahl von ihnen verloren gehen können, selbst wenn man davon absieht, daß eine enorme Menge der Spermatozoen bei der Dispersion der Follikelzellmasse durch Agglutination mit den Follikelzellen schon vor der Fixierung vom Ei losgeht (YAMANE 1935 a). Die hier angegebene Zahl ist daher nicht als die wirkliche der ein Tubenei erreichten Spermatozoen sondern als ihre Mindestzahl zu betrachten.

Tabelle 1. Übersichtstabelle über die Zahl der ein Tubenei erreichten Spermatozoen exklusive dasjenige, welches sich in der Eizelle in den Spermakern umgewandelt hat

Nr. der Versuchstiere	Alter der Eier bei der Entnahme	Alter der Eier bei der Fixierung	Nr. der Tubeneier	Zahl der Spermatozoen im perivitellinen Raum	Mindestzahl der ein Ei erreichten Spermatozoen
K. 57	13½ Stunden post coitum	16 Stunden post coitum	TE 303	8	30
			TE 304	4	17
			TE 305	5	19
K. 58	15 „	18 „	TE 312	8	23
K. 60	17 „	19 „	TE 326	3	27
K. 62	18 „	19¼ „	TE 341	6	34
K. 51	20 „	21½ „	TE 268	2	8
			TE 269	3	11
K. 52	20 „	22 „	TE 280	7	25

Bemerkung: Bei allen hier in Betracht kommenden Eiern war schon in der Eizelle je ein Spermakern gebildet.

Aus der obigen Tabelle ist ersichtlich, daß bei der normalen Befruchtung mehr als 3 Spermatozoen in den perivitellinen Raum eindringen können und die Gesamtzahl der Spermatozoen die gegen ein Ei ansammeln, mindestens 9 beträgt, wenn man einen Spermakern mitrechnet.

Die Bildung der zweiten Polzelle ist spätestens 13½ Stunden

post coitum vollendet, so daß man in diesem Zeitpunkt stets zwei große Polzellen findet, die eine erste und eine zweite Polzelle darstellen. In noch späteren Zeitpunkten erfährt die erste Polzelle eine nochmalige Teilung; es entsteht dadurch die dritte Polzelle, die sich durch seine kleinere Form auszeichnet. Da, wie vorläufig mitgeteilt (YAMANE 1930), das Eindringen des Spermatozoon für die Bildung der zweiten Polzelle eine unentbehrliche Vorbedingung ist, so ergibt sich die allgemeine Regel, daß wenn die zweite Polzelle gebildet ist, das Spermatozoon schon in die Eizelle eingedrungen ist.¹⁾ In der Tat bei der Lebendbeobachtung der Tubeneier, die zwischen 13½–20 Stunden nach der fertilen Kopulation gewonnen wurden, kommen im optischen Schnitt ein Eikern und ein Spermakern zum Vorschein, wenn die stehengebliebenen Coronazellen von der Eihülle vollkommen abgesäubert werden.²⁾ Die beiden Geschlechtskerne lassen sich nämlich in der Eimitte, und zwar im Hof dotterarmen Zytoplasmas, als zwei je nach der Beleuchtung bald heller bald dunkler erscheinende Bläschen ohne Schwierigkeit erkennen, indem sie schon sehr dicht beieinander liegen (Taf. 21, Abb. 1). Dieses Verhalten kann auf Schnitten genauer festgestellt werden (Taf. 21, Abb. 2). Welcher der beiden Geschlechtskerne männlich oder weiblich ist, läßt sich vorderhand nicht leicht bestimmen. Es liegt aber nahe, daß der in der Eimitte liegende, größere den Eikern und der etwas seitlich liegende kleinere den Spermakern darstellt. Verfolgung der Serienschritte von mehr als 80 Eizellen ließ sich bestätigen, daß außer den oben beschriebenen Geschlechtskerne keine anderen Zellelemente von männlicher Abstammung innerhalb der Eizelle zu finden waren, sei es in Form des Spermakerns, sei es in Form des Spermakopfes.

Wie oben angegeben, betrug die Zahl der Spermatozoen, die schon im perivitellinen Raum lagen, weshalb direkt in die Eizelle gelangen könnten, mindestens 3. Trotzdem wurde bei allen untersuchten Eiern stets einziger Spermakern gebildet. Es läßt sich daher schließen, daß das reife Kaninchenei bei der normalen Befruchtung für das Eindringen nur eines Spermatozoon eingerichtet ist.

Bevor wir die Beschreibung der normalen Befruchtung verlassen, möchten wir noch auf das Verhalten des unbesamten Tubeneies aufmerksam machen. Das Kaninchenei bei der Ovulation, die normalerweise gegen 10 Stunden post coitum erfolgt, ist stets mit einer Polzelle d.h. der ersten Polzelle ausgerüstet, was sich bei der

1) Näheres darüber soll in der nachfolgenden Abhandlung gesondert behandelt werden.

2) Es sei hier besonders bemerkt, daß bei der Feststellung der Geschlechtskerne im lebenden Ei vollständige Beseitigung der Coronazellen und genau axiale Stellung des Eies sehr wichtig sind. Sonst verwechselt man leicht Coronazellen und Polzellen mit bläschenartigen Geschlechtskernen.

Lebendbeobachtung ohne weiteres feststellen läßt. Bei Schnittuntersuchung ergibt sich andererseits, daß in diesem Stadium die zweite Polarspindel am Eipol sich lagert, und zwar zum Eiradius parallel stehend.¹⁾ Bleibt das Ei unbesamt, so wird es immer in derselben Phase wie bei der Ovulation sistiert; die zweite Reifungsteilung ist gehemmt und das Ei besitzt immer noch nur eine erste Polzelle (vgl. YAMANE 1930, Textabb. 2; 1935 a, Textabb. 4).

IV. Experimente

Wesentlich anders als *in vivo* verhält sich der Befruchtungsprozeß bei der künstlichen Besamung *in vitro*. Hierbei tritt nicht nur Monospermie sondern auch Polyspermie auf. Es kann sogar mono- und polysperme „Befruchtung“ der zweiten Polzelle vorkommen.

Die in dieser Hinsicht gemachten Schnittuntersuchungen beziehen sich mit etwa 33 Tubeneiern und zwar aus 7 Versuchstieren. Aus den oben geschilderten technischen Gründen waren aber nicht alle Fälle entscheidend, so daß ich nicht imstande bin, hinsichtlich eine statistische Übersicht anzugeben. Wir beschränken uns daher vorderhand auf die Befunde von 7 typischen, aus einer größeren Anzahl ausgesuchten Fällen.

A. Betrachtung einzelner Fälle

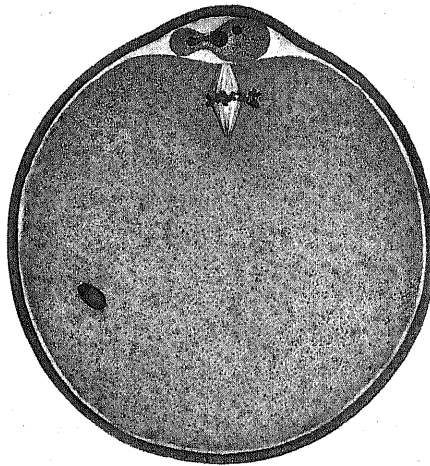
Fall 1: TE 179 (K. 32)

Dieses Ei wurde eine Stunde nach der Entnahme besamt und 6 Stunden danach d.h. 20½ Stunden post coitum im BOUINS Gemisch fixiert. Es wurde beinahe axial geschnitten. Bei der Schnittuntersuchung ergab sich folgendes Bild (Textabb. 2): Die Eizelle liegt der Eihülle so eng an, daß kein Zwischenraum zwischen den beiden bis auf die Polsphäre vorhanden ist. So entsteht eine scharf begrenzte „Polkammer“. Die erste Polzelle, die in dieser Polkammer liegt, ist eben in der nochmaligen Teilung begriffen, indem die zu bildende dritte Polzelle von der ersten noch mit einer Plasmabrücke verbunden ist. Hervorzuheben ist hierbei, daß die Chromosomen der ersten Polzelle überhaupt zusammengeballt sind und in diesem Zustand in die dritte Polzelle ohne Mitose hineinzuströmen scheinen; es fehlt Spindelfaserbildung gänzlich. Die nochmalige Teilung der ersten Polzelle beim Kaninchen scheint somit ganz abortiv und zwar amitotisch zu sein.

Am Eipol lagert sich die zweite Polarspindel in der Metaphase.

1) Nach PINCUS und ENZMANN (1935) tritt diese Phase der Reifungsteilung schon 9 Stunden post coitum auf (vgl. ihre Tafelabb. 7).

Verfolgt man nun Serienschritte aufeinander, so findet man 5 Spermaköpfe im Ooplasma; 2 von ihnen liegen im Polfeld und die anderen 3 befinden sich auch an der Zellperipherie anderer Abschnitte. Im Prinzip nehmen die Spermaköpfe nahezu zentripetale Richtungen ein, wenn sie auch mehr oder weniger tangential gestellt werden können. Auffallend ist, daß die in die Eizelle eingedrungene Spermaköpfe Mittelstück und Schwanzfaden entbehren. Daß das Mittelstück dem im Ei liegende Spermakopf fehlt, ist an der Form des hinteren Kopfendes zu erkennen; der genannte Teil ist deutlich eingekerbt. Am Spermakopf läßt sich auch keine Asterenbildung nachweisen. Jedenfalls ist das Ei trotz des Eindringens mehrerer Spermatozoen im Stadium der Oocyte II. Ordnung sistiert worden, während die erste Polzelle eine weitere Teilung erfahren hat.



Textabb. 2. Axialer Schnitt durch ein *in vitro* besamtes Tubenei (TE 179). Oben in der Polkammer ist die erste Polzelle in der nochmaligen Teilung begriffen; die zusammengeballten Chromosomen gehen amitotisch in die andere Hantelhälfte über. Am Eipol liegt die zweite Polarspindel; links unten im Ooplasma befindet sich ein Spermakopf. Das Bild wurde aus zwei aufeinander folgenden Schnitten hergestellt. Vergr. 600×.

Fall 2: TE 203 (K. 35)

Das Ei wurde mit sehr dickem Sperma besamt, 4 Stunden nach der Besamung d.h. 18½ Stunden post coitum im BOUIN-AlLENS Gemisch fixiert.

Auf den Serienschritten, die axial getroffen wurden, fällt starke Polyspermie auf (Taf. 22, Abb. 1); es läßt sich im ganzen etwa 10 Spermaköpfe im Ooplasma zählen, wenn auch geschnittene Kopfstücke zur genauen Zahlenbestimmung Schwierigkeiten machen. Sie liegen nicht tiefer als Rindenschicht der Eizelle. Nach ihren zentripetalen Stellungen beurteilt, sind die Spermaköpfe von allen Punkten der Eioberfläche her eingedrungen. Auch hierbei weder Schwanzfaden noch Mittelstück sind im Ooplasma nachzuweisen; Zentrosomen und Strahlenbildung kommen nicht zum Vorschein. Am Eipol liegt die zweite Polarspindel, die dasselbe Bild wie zur Zeit der Ovulation bewahrt. Es verhält sich aber bei der Polzelle etwas anders. Hier befindet sich nur erste Polzelle in Polkammer (YAMANE 1935 a, Taf.

5, Abb. 2). Ihre Chromosomen liegen ganz unregelmäßig; sie zeigen noch keine Neigung dritte Polzelle zu bilden. Die erste Polzelle verharrt sich demnach auch in derselben Phase der Oogenese wie bei der Ovulation.

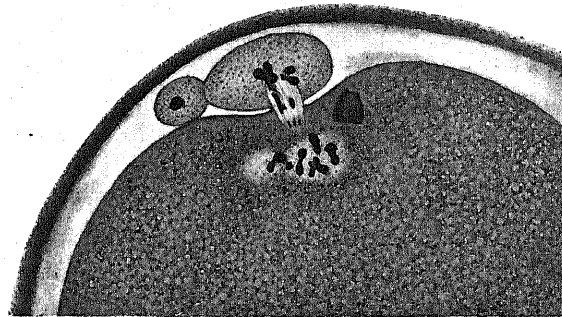
Fall 3: TE 193 (K. 34)

Das Ei wurde 5½ Stunden nach der Besamung d. h. 20½ Stunden post coitum nach BOUIN-ALLEN fixiert; es wurde beinahe axial geschnitten. Der Schnittbefund dieses Eies ist prinzipiell der gleiche wie der des Falls 2: Verharrung der Eizelle sowie der ersten Polzelle in derselben Phase wie bei der Ovulation. Sehr bezeichnend ist jedoch, daß 2 von 5 im Ooplasma liegenden Spermaköpfen nach dem Eintritt eine Umdrehung um 180° erfuhren. Die beiden Spermaköpfe stellten sich nämlich an der Zellperipherie zentrifugal, indem sie ihre Spitze nach außen wandten (Taf. 22, Abb. 2).

Hieraus scheint es, daß auch beim Kaninchen der ins Ei eingedrungene Spermakopf vor der Umgestaltung in den Spermakern eine Umdrehung erfährt, was wahrscheinlich eine für alle Tiere geltende Erscheinung ist. Diese Phase der Befruchtungsvorgänge scheint allerdings in einer sehr kurzen Zeitspanne abzulaufen, da sie in den Schnitten sehr selten vorkommt.

Fall 4: TE 201 (K. 35)

Dieses Ei wurde ebenfalls wie beim Fall 2 behandelt und auch axial geschnitten. Die Schnittbilder des Eies zeigten jedoch ganz anders (Taf. 21, Abb.



4, 5, 6 und Textabb. 3): Das Ei ist in der zweiten Reifungsteilung begriffen; zweite Polzelle ist eben von der Eimutterzelle abgeschnürt.

Die ellipsoidische zweite Polzelle enthält Tochterchromosomen in der Telo-phase, während einige stäbchenförmige Chromosomen noch im zwischen Polzelle und Eizelle liegenden Stemmkörper blei-

Textabb. 3. Axialer Schnitt durch ein *in vitro* besamtes Tubenei (TE 201). Das Ei ist in der zweiten Reifungsteilung begriffen; die zweite Polzelle ist schon bis auf Stemmkörper abgeschnürt. Dicht den Tochterchromosomen im Polfeld liegt ein Spermakopf, deren Vorderstück z. T. abgeschnitten ist. Links von zweiter Polzelle lagert sich eine abortive dritte Polzelle, deren Chromosomen nur als Kügelchen auftreten. Das Bild wurde aus zwei aufeinander folgenden Schnitten hergestellt (vgl. Taf. 21, 4 und 5). Vergr. 1,000×.

ben. Es liegt also eine verzögerte Chromosomenversorgung der zweiten Polzelle vor. Die Tochterchromosomen des Reifeies lagern sich am Eipol, indem sie einigermaßen irregulär angeordnet und von einem ausgesprochen hellen Hof umgeben sind, und Anzeichen der bläschenartigen Umgestaltung aufweisen. Die erste Polzelle hat schon eine nochmalige Teilung erfahren, so daß neben ihr eine kleine dritte Polzelle liegt, deren Chromosomen nur als ein Kügelchen zu erkennen ist. Erste Polzelle selber erscheint fast zugrundegehend; sie ist so stark abgeplattet, daß sie im Durchschnitt eine Spindelform zeigt, und ihre ganze Umrisse überhaupt schleierhaft auftritt. Ihre Chromosomen bilden einige Klumpen. Dieses Abplatten der ersten Polzelle ist vielleicht durch den von Erhebung des Eipols bedingten Druck hervorgerufen (Taf. 21, Abb. 6).

Was das ins Ei eindringende Spermatozoon anlangt, so befindet sich der einzige Spermakopf ohne Strahlenbildung ganz dicht den Tochterchromosomen am Eipol, und zwar seine Spitze nach diesen zuwendend; der Kopf bewahrt noch seine Form. Außer dem genannten Spermakopf läßt sich keine anderes Spermatozoon im Innere des Eies nachweisen. Hier liegt typische Monospermie vor. Dieses Ei gibt uns also diejenige Phase des Befruchtungsprozesses, bei dem das Spermatozoon gerade in die Eizelle eingedrungen ist und das Ei darauf eben zu reagieren beginnt.

Sehr bemerkenswert ist, daß wenn man nach Lage und Richtung des Spermakopfes beurteilt, das Spermatozoon hierbei vom Eipol her eingedrungen ist. Ganz übereinstimmend mit den oben geschilderten Fällen ist weder Mittelstück noch Schwanzfaden des Spermatozoon im Ei nachzuweisen. In Polkammer neben der zweiten Polzelle liegt noch ein Spermakopf, dem ebenfalls Mittelstück und Schwanz ganz abgerissen worden sind (Taf. 21, Abb. 4).

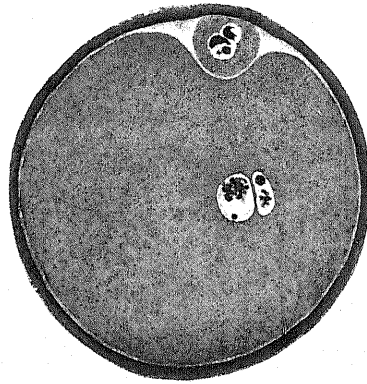
Fall 5: TE 182 (K. 33)

Bei diesem Ei erfolgte die Fixierung 8 Stunden nach der Besamung d.h. $22\frac{1}{4}$ Stunden post coitum, und zwar im BOUINS Gemisch; es wurde axial geschnitten.

Die Schnittuntersuchung zeigte folgendes (Textabb. 4): Im Innere des Eies, etwas seitlich verschoben, liegen zwei kleine ovale Bläschen mit Chromosomenaggregaten sehr dicht nebeneinander, sie sind in Form und Größe spiegelbildlich gleich, wenn man zwei aufeinander folgende Schnitte vergleicht. Sie stellen offenbar zwei Geschlechtskerne dar, die sich zur Kopulation gegeneinander annähern sind. Außer den hier geschilderten Geschlechtskernen läßt sich keine Spur vom Spermatozoon im Eiinneren nachweisen, sei es in Form des Spermakopfes, sei es in Form des Spermakerns. Es liegt

hier typische Monospermie vor, worauf die Eizelle noch weiter reagiert hat als beim Fall 4.

In der Polkammer befinden sich nun zwei große Polzellen. Die eine ist mehr oder weniger abgeplattet und enthält unregelmäßig



Textabb. 4. Axialer Schnitt durch ein *in vitro* besamtes Tubenei (TE 182). Das Polfeld der Eizelle ist durch Abstoßung der Polzellen ausgehöhlt, so daß hier eine Polkammer entsteht. In dieser Polkammer liegt die zweite Polzelle, die einen eigenen Kern (Polkern) und einen mit diesem vereinigten Spermakern enthält. Im Ooplasma befinden sich Eikern und Spermakern, die sich zur Kopulation gegeneinander angenähert sind. Vergr. 600×.

verteilten Chromosomen; auf Grund der Befunde im Fall 4 ist diese als erste Polzelle zu betrachten. Folgerichtig läßt sich die andere Polzelle als die zweite ohne weiteres bestimmen. Überraschenderweise enthält diese Polzelle zwei bläschenartige Kerne, die noch richtige Kernwand entbehren, aber scheinbar je einen Nukleolus besitzen. Da keine anderen Chromosomen in dieser Polzelle vorhanden sind, haben wir den einen für den Ruhekern zu halten, der von den durch die zweite Reifungsteilung entstandenen Tochterchromosomen ausgebildet ist. Sollte der eine wirklich Kern der Polzelle, Polkern, sein, so haben wir weiter den andern als Abkömmling vom Spermatozoon, Spermakern, zu betrachten. Wenn die beiden Kerne auch morphologisch sich voneinander kaum unterscheiden lassen, sind

sie kleiner als die im Eiinneren liegenden; das Anwachsen des Kerns ist demnach ausgeblieben. Auf jeden Fall haben wir hier monosperme „Befruchtung“ der zweiten Polzelle vor uns.

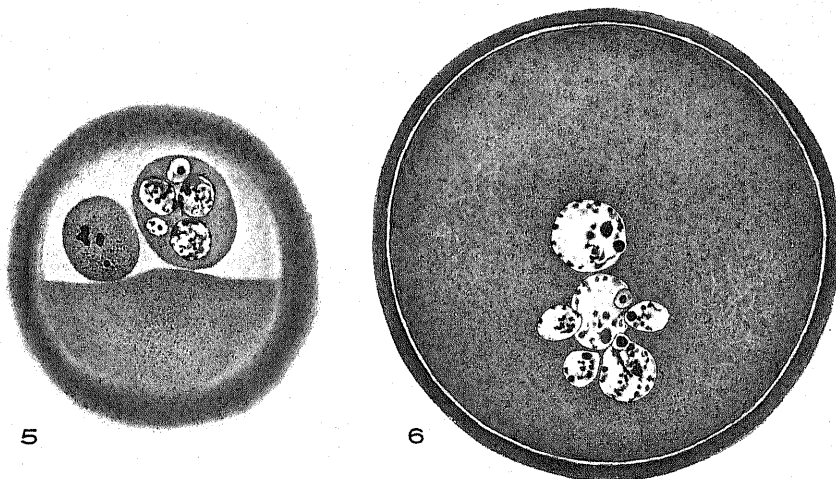
Fall 6: TE 183 (K. 33)

Die Besamung und Fixierung des Eies erfolgten ganz gleichzeitig und gleichartig mit dem Fall 5.

Das Ei wurde vom Pol nach der entgegengesetzten Seite hin etwas schräg zur Äquatorialebene geschnitten. Im ersten Schnitt kamen daher schon zwei große Polzellen zum Vorschein (Textabb. 5). Die eine besitzt Chromosomen in ebenso unregelmäßiger Verteilung, läßt sich daher als erste Polzelle kennzeichnen. Die andere, die demnach nicht anderes zu erwarten ist als zweite Polzelle, enthält wieder erstaunlich 5 verschieden große Kerne, die sich durch deutliche Membran, helle Grundsubstanz und anscheinend je einen Nukleolus in Verbindung mit Chromatinnetz auszeichnen. Das ganze Verhalten

dieser Kerne ist genau dasselbe mit den im Ooplasma liegenden Kernen, die nachfolgend geschildert werden sollen. Die beiden Polzellen sind in der Größe fast gleich, aber in der Beschaffenheit ihres Protoplasma sehr verschieden. In der ersten Polzelle ist das Protoplasma ebenso granulareich bzw. dunkelgefärbt wie im Polfeld der Eizelle, während die zweite Polzelle granulaarmes bzw. hellgefärbtes Protoplasma aufweist.

In weiteren Schnitten treten nun 2 bis 6 bläschenartige Kerne im Inneren der Eizelle aufeinander auf (Textabb. 6). Genaue Bestimmung ihrer Gesamtzahl ist trotz der Rekonstruktion schwer auszuführen, da es hier eine starke Kernaggregation vorliegt. Es läßt sich aber wenigstens 7 oder 8 Kerne im ganzen Eiinneren zählen.



Textabb. 5. Schräger Schnitt durch die Polkammer eines *in vitro* besamten Tubeneies (TE 183). In der Polkammer befindet sich links die dunkler erscheinende erste Polzelle, die unregelmäßig verteilten Chromosomen enthält und rechts die heller erscheinende zweite Polzelle, die einen Polkern und 4 Spermakerne aufweist. Die untere Hälfte zeigt das Polfeld des Ooplasmas. Vergr. 600×.

Textabb. 6. Schräger Schnitt durch die Mitte desselben Eies mit dem in Textabb. 5 gezeichneten (TE 183). Im Ooplasma befinden sich 7 Geschlechtskerne, die einen Eikern und 6 Spermakerne darstellen müssen. Das Bild wurde aus zwei aufeinander folgenden Schnitten hergestellt. Vergr. 600×.

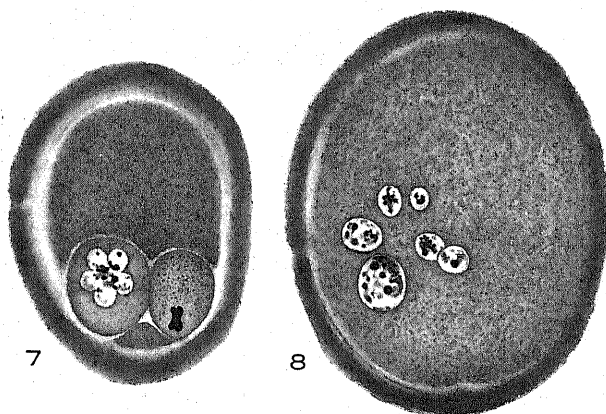
Die genannten Kerne sind, wenngleich schwankend, im großen ganzen stark angewachsen; sie sind durch eine Membran gegen die Nachbarschaft deutlich abgegrenzt und besitzen eine ganz helle Grundsubstanz, einen oder zwei Nukleoli und ein meistens exzentrisch liegendes Chromatinnetz. Wir haben hier also ein Kernaggregat vor uns, welches aus einem Eikern und 6 oder 7 Spermakernen besteht. Daß einer von ihnen Eikern sein sollte, geht daraus hervor, daß das Ei schon zweite Reifungsteilung beendet infolgedessen zweite Polzelle abgestoßen hat. Obwohl sich einzelner Kern geschlechtlich nicht

leicht bestimmen läßt, liegt die Vermutung jedoch näher, daß der in der Mitte des Aggregates liegende große Kern Eikern sein mag, während die übrigen die danach zur Kopulation ansammelnden Spermakerne vertreten könnten. Die Wahrscheinlichkeit dieser Auffassung wird dadurch verstärkt, daß die an der Peripherie liegenden Kerne nicht ganz kugelförmig sind, sondern nach dem in der Mitte liegenden mutmaßlichen Eikern hin mehr oder weniger zugespitzt erscheinen als wenn sie zur Kopulation geneigt wären (Textabb. 6). Das geschilderte Ei stellt also einen Fall der Polyspermie, bei dem die ins Ei gelangten Spermaköpfe schon Umbildung zu den bläschenförmigen Spermakernen und das weitere Anwachsen erfahren haben.

Kommen wir nunmehr wieder dem Befund der zweiten Polzelle zurück, so finden wir, daß die Kernverhältnisse hierbei von denjenigen im Ei nicht wesentlich verschieden sind. Gegenüber jenen fällt nur hier auf, daß das Kernwachstum beträchtlich gehemmt ist. Demnach stellt einer von 5 Kernen in der zweiten Polzelle ihren Ruhekern dar, während die übrigen die Spermakerne sein müssen. Es liegt also wieder „Befruchtung“ der zweiten Polzelle vor, bei der, mit der Eizelle Hand in Hand gehend, starke Polyspermie in Erscheinung getreten ist.

Fall 7: TE 194 (K. 34)

Das Ei wurde 6 Stunden nach der Besamung d.h. 21 Stunden post coitum in BOUIN-AlLENS Flüssigkeit fixiert. Der Befund



Textabb. 7. Lattitudinaler Schnitt durch die Polkammer eines *in vitro* besamten Tubeneies (TE 194). Das linke heller erscheinende Körperchen ist die zweite Polzelle, die z. T. miteinander verschmolzene 5 Geschlechtskerne enthält. Das rechte dunkler erscheinende Körperchen mit Chromosomen ist die erste Polzelle. Vergr. 600 \times . Textabb. 8. Lattitudinaler Schnitt durch die Innere von demselben Ei mit dem in Textabb. 7. angegebenen. Im Ooplasma liegen 6 Geschlechtskerne, die noch nicht ganz aggregiert sind. Vergr. 600 \times .

bei der Schnittuntersuchung ist im wesentlichen gleichartig mit dem obigen Fall 6. Im ersten Schnitt treten schon zwei große Polzellen auf, was nahezu einen Lattitudinalschnitt durch die Polkammer zeigt (Textabb. 7). Auf Grund der bisherigen Befunde läßt sich die eine, die Chromosomen besitzt, als erste Polzelle und die andere, die 5

Kerne enthält, als polysperm befruchtete zweite Polzelle kennzeichnen. In der letzteren sind die 5 rundlichen Kerne an ihren Berührungsstellen miteinander verschmolzen, so daß hier ein pentaploides Synkaryon entstehen könnte, wenn die Polzelle noch weiter leben würde.

In der Gegend der Eimitte liegen etwa 8 verschieden große aber gleichfalls rundliche Kerne, die zweifellos einen Eikern und 7 Spermakerne darstellen, obwohl sich die beiden geschlechtlich nicht leicht voneinander unterscheiden lassen (Textabb. 8). Hier hat noch keine Kernkopulation stattgefunden.

B. Zusammenfassende Betrachtung der Fälle

Aus den oben geschilderten Besamungsversuchen mit Kaninchenei *in vitro* geht hervor, daß es sich eine große Mannigfaltigkeit von verschiedenen Befruchtungsmodi ergibt. Es kann normalerweise Monospermie vorkommen, es tritt aber häufiger Polyspermie in Erscheinung. Sehr erstaunlich ist, daß auch die zweite Polzelle monosperm oder polysperm befruchtet wird. Wir beginnen die zusammenfassende Betrachtung mit der Eizelle und behandeln Polzellen gesondert.

1. Eizelle

Von den oben beschriebenen 7 Fällen zeigen der vierte und der fünfte normale monosperme Befruchtung, die sich resp. in Abstoßung der zweiten Polzelle und in der Bildung des Ei- und Spermakerns erweist. Dabei scheint die Umbildung des Spermatozoon in den Spermakern mit der Umbildung der Tochterchromosomen des Reifeies in den Eikern zeitlich übereinstimmend vorzugehen. Sobald der Spermakopf in die Eizelle eindringt, wird die zweite Polzelle ausgestoßen. In der späten Telophase der zweiten Reifungsteilung ist aber der Spermakopf zu den Spermakern noch nicht umgewandelt (Textabb. 3), und erst bei der Umbildung der Eichromosomen in den Eikern gestaltet er sich in den Spermakern um.

Die beiden Geschlechtskerne rücken weiter in die Eimitte und nähern sich gegeneinander um zu kopulieren (Textabb. 4). Würde das Ei daher in geeignetem Medium mit genügendem Stoffaustausch kultiviert, so hätte die vollständige Verschmelzung des Eikerns mit dem Spermakern ja sogar nachträgliche Furchung stattgefunden. In der hier als Medium verwendeten Tyrodelösung jedoch scheint das Kaninchenei nicht imstande zu sein, im Befruchtungsprozeß so weit fortzuschreiten, daß es zur Bildung eines Furchungskerns kommt.

Sehr auffällig ist nun, daß das Kaninchenei bei der künstlichen Besamung *in vitro* sehr leicht der starken Polyspermie unterliegt, die weiter zur Bildung der Spermakerne fortschreiten kann, um endlich

das Ei zu aktivieren. Die Aktivierung der Eizelle durch Polyspermie war im sechsten und siebenten Fall der Experimente zu sehen. Hier trat die Abstoßung der zweiten Polzelle schon zutage. In der Eimitte befand sich ein Kernaggregat, welches aus 7 oder 8 verschieden großen, bläschenartigen Kernen bestand (Textabb. 6 u. 8). Wenn diese Kerne sich auch im einzelnen ihre Geschlechtszugehörigkeit nicht leicht bestimmen ließen, kann es nicht zweifelhaft sein, daß sie die Geschlechtskerne darstellten. Hieraus scheint, daß auch in der Polyspermie die Eikernbildung mit der Spermakernbildung zeitlich zusammenfällt, obwohl das Kernwachstum in beträchtlichem Maße schwankt. Nach dem Zustand der Kernaggregation kann man ferner schließen, daß alle Spermakerne Tendenz besitzen mit dem Eikern zu vereinigen (Textabb. 6). Weitere Entwicklung des polysperm befruchteten Eies war jedoch leider in der Tyrodelösung nicht zu verfolgen.

Etwas anders verhielt sich die Polyspermie im ersten, zweiten und dritten Fall. Hier blieb das Ei ohne morphologische Veränderungen aus, indem es noch in demselben Stadium wie bei der Ovulation d.h. im Stadium der Oocyte II. Ordnung sistiert wurde. Trotz des Eindringens mehrerer Spermaköpfe kam Teilung der vertikal gestellten, zweiten Polarspindel der Eizelle bzw. Bildung des Eikerns nicht vor. Daß dies aber nicht von der Stärke der Polyspermie bedingt war, erweist sich die Tatsache, daß die Gesamtzahl der ins Ei gelangten Spermaköpfe hierbei innerhalb 5 bis 10 schwankte, während dieselbe bei aktivierten Fällen 7 oder 8 betrug. Das Ausbleiben der zweiten Reifungsteilung in der Eizelle ist demnach keine Folgeerscheinung der Polyspermie; wir haben es vielmehr mit zeitlichen Verhältnissen zu tun: frühere Stadien der Polyspermie. Wie man in Tabelle 2 sieht, beginnt die Abstoßung der zweiten Polzelle erst 18½ Stunden post coitum und die Bildung der beiden Geschlechtskerne erfolgt kaum früher als 21 Stunden post coitum.

Tabelle 2. Zeitliche Verhältnisse der Spermakern- und Eikernbildung bei der künstlichen Besamung des Kanincheneies *in vitro*

	Fall	Ei-Nr.	Zeitpunkt der Fixierung in Stunden		Zahl der ins Ooplasma eingedrungenen Spermaköpfe	Spermakernbildung	Eikernbildung	Abstoßung der zweiten Polzelle
			nach der Besamung	nach der sterilen Kopulation				
Monospermie	4	TE 201	4	18½	1	—	—	±
	5	„ 182	8	22¼	1	+	+	+
Polyspermie	1	„ 179	6	20½	5	—	—	—
	2	„ 203	4	18½	ca 10	—	—	—
	3	„ 193	5½	20½	5	—	—	—
	6	„ 188	8	22¼	6 oder 7	+	+	+
	7	„ 194	6	21	7	+	+	+

Wir kommen nunmehr zur Frage des Eindringens des Spermatozoon in die Eizelle. Bei der Polyspermie treten die Spermatozoen von jedem Punkt der Eioberfläche ein, während bei der Monospermie das Spermatozoon vom Eipol hineinzudringen scheint. Der letztere Befund ist jedoch noch an der größeren Anzahl der Fälle nachprüfungsbedürftig. Sowohl im monosperm befruchteten als auch im polysperm befruchteten Ei ist keine, einem Empfängnishügel ähnliche Erhebung des Ooplasmas an der Eintrittsstelle des Spermatozoon zu erkennen. Bei allen Fällen tritt der Kopf allein von den Abschnitten des Spermatozoon im Ooplasma auf. Das Spermazentrosom ist auch unsichtbar. Ob der stark färbbare Hinterteil des Kopfes das dicht hinter ihm gelegene Zentrosom verdeckt, wie SOBOTTA und BURCKHARD (1910) bei ihren Untersuchungen an Ratteneiern annahmen, oder ob das Zentrosom im Ooplasma schon resorbiert ist, ist schwer zu entscheiden. Jedenfalls fehlt hier die Asterenbildung gänzlich. Unzweifelhaft ist ferner, daß das Spermatozoon im Ooplasma schon Mittelstück und Schwanzfaden entbehren. Es haben bisher verschiedene Forscher bei verschiedenen Säugetieren, nämlich VAN DER STRICHT (1902) bei der Fledermaus (*Vesperugo*), SOBOTTA und BURCKHARD (1910) bei der Ratte, RUBASCHKIN (1905) und LAMS (1913) beim Meerschweinchen, und KIRKHAM (1907), LAMS und DOORME (1907) bei der Maus, den ins Ei eingedrungenen Schwanzfaden des Spermatozoon beobachtet. KREMER (1924) konnte dagegen im Mausei selbst auf sehr frühen Stadien der Befruchtung keinen Schwanzfaden beobachten und vermutete, daß er bald, nachdem er funktionslos geworden, einer Auflösung anheimfalle. In den vorliegenden Experimenten kam es niemals vor, daß das Spermatozoon samt dem Mittelstück und Schwanzfaden im Ooplasma liegt. Ob sie erst nach dem Eindringen im Ooplasma aufgelöst werden, oder ob sie schon beim Eindringen vom Kopf abgetrennt werden, läßt sich noch nichts Sicheres sagen, denn schwanzlose Spermaköpfe können ebenfalls außerhalb der Eihülle auftreten (Taf. 21, Abb. 3). Es liegt nahe, daß der Schwanzfaden des Spermatozoon überhaupt in der Umgebung des Eies leicht auflösbar wird.

Eine Zeit lang nach dem Eintritt nimmt der Spermakopf eine zentripetale Stellung ein (Taf. 22, Abb. 1). Bevor er sich zum Spermakern umwandelt, erfährt er aber anscheinend, wie bei allen anderen Tierarten der Fall ist, eine Umdrehung um 180° , wodurch er zentrifugal gestellt wird (Taf. 22, Abb. 2). Der Gesamtprozeß von der Umdrehung des Spermakopfes bis zur Umgestaltung in den bläschenartigen Spermakern scheint allerdings innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne abzulaufen, da sie in den Schnitten seltens zum Vorschein kommen.

2. Erste Polzelle

Wie schon geschildert, geht das Ei beim Kaninchen stets in Ausrüstung mit der ersten Polzelle in den Eileiter über. Diese erfährt in den meisten Fällen eine nochmalige Teilung, um die dritte Polzelle zu produzieren, so daß man in Polkammer 3 Polzellen findet (YAMANE 1930, Taf. 22, Abb. 2 a u. b). Diese Teilung geschieht *in vitro* etwa 6 Stunden nach der Besamung d.h. 20½ Stunden post coitum, da der Fall 1 zu diesem Zeitpunkt gerade Teilungsfigur aufwies. Sehr auffallend ist, daß die weitere Teilung der ersten Polzelle nicht mitotisch sondern amitotisch erfolgt; es läßt sich keinenfalls Spindelfasern erkennen. Die erste Polzelle schnürt sich nämlich hantelförmig ein, wenn auch nicht symmetrisch, und ihre zusammengeballte Chromosomen fließt teilweise in die abgeschnürte Hantelhälfte hinein (Textabb. 2). Die auf diese Weise entstandene, dritte Polzelle ist viel kleiner als ihre Mutterzelle d.h. die endgültige erste Polzelle, auch als ihre Schwesterzelle d.h. die zweite Polzelle, so daß sie sich schon bei der Lebendbeobachtung ohne weiteres kennzeichnen läßt. Weder in der ersten noch in der dritten Polzelle bildet sich ein Ruhekern.

Von besonderer Bedeutung ist, daß erste Polzelle trotz der starken Polyspermie in der Eizelle kein Spermatozoon eindringen läßt (Fall 1, 2 u. 3). Auch in den Fällen, wo zweite Polzelle der starken Polyspermie anheimgefallen ist, bleibt sie unbefruchtet (Fall 6 u. 7). Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Polzelle im Verhalten mit dem Spermatozoon ist allerdings nicht der Zellgröße zurückzuführen, da die erste Polzelle in der Regel größer ist als die zweite. Es hängt vielmehr vom Unterschied der Beschaffenheit des Zytoplasmas ab, worüber ich später in der anderen Abhandlung besprechen möchte. Die nochmalige Teilung der ersten Polzelle kann daher ganz unabhängig vom Spermatozoon zustandekommen. Auch im Fall, wo ihre Mutterzelle d.h. die Oocyte II. Ordnung ungeteilt bleibt, kann die erste Polzelle einer weiteren Teilung unterliegt werden. Somit ist die letztere Zellteilung von der ersteren Zellteilung unabhängig.

3. Zweite Polzelle

Die Abstoßung der zweiten Polzelle erfolgt erst nach dem Eintritt des Spermatozoon in die Eizelle; die Chromosomen der zweiten Polarspindel werden nämlich erst dadurch in Tätigkeit gebracht. Es hängt dabei nicht von der Modus der Befruchtung ihrer Mutterzelle ab, ob sie monosperm oder polysperm ist (vgl. Tabelle 2).

Ganz überraschend ist der Befund, daß ein oder mehrere Spermatozoen in die zweite Polzelle eindringt. Wie im reifen Ei kann dabei

nicht nur Monospermie (Fall 4 u. 5) sondern auch Polyspermie (Fall 6 u. 7) eintreten. Der penetrierte Spermakopf kann sich sogar in den Spermakern umwandeln und die Chromosomen der zweiten Polzelle bilden ebenfalls einen ruhenden Kern, Polkern. Die gebildeten Spermakerne sind geneigt mit dem Polkern zu vereinigen. Da im Normalfall die Chromosomen der Polzellen in keinen richtigen Ruhezustand eingehen, sondern in wenig verändertem Zustand vorhanden sind, so ist diese Polkernbildung als Reaktion auf das Eindringen des Spermakopfes zu betrachten. Somit können in der zweiten Polzelle durch Penetration des Spermakopfes zweierlei Reaktionen veranlaßt werden: Umwandlung der Chromosomen in den Polkern und Umwandlung des eingedrungenen Spermakopfes in den Spermakern.

Sehr bezeichnend ist schließlich, daß das Zytoplasma der polysperm befruchteten Polzelle an Körnchen bedeutend ärmer ist, dementsprechend viel heller erscheint als das des Polfeldes der Eizelle.

V. Besprechung der Ergebnisse

In erster Linie zu erwähnen ist, daß das reife Kaninchenei unter normalen Verhältnissen für die Monospermie eingerichtet ist. Es treten mehr als ein Spermatozoon in den perivitellinen Raum ein und gelangen an die Zellmembran des Eies; trotzdem kommt die Polyspermie niemals vor. Während KIRKHAM (1907) und KREMER (1924) bei der Maus monosperme Befruchtung übereinstimmend feststellten, beschrieben SOBOTTA und BURCKHARD (1910, S. 482) bei der Ratte: „Auffällig häufig, ganz im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Maus, wurden mehrere Spermatozoen im Ei gefunden, insbesondere öfters ein solches, das im Eindringen begriffen war und noch teilweise zwischen Ei und Oolemma gelegen war, während ein anderes bereits im Ooplasma sich befand und die oben beschriebenen ersten Umbildungserscheinungen erkennen ließ“. Da das Oolemma nach der Auffassung der genannten Autoren keine richtige Zellmembran der Eizelle sondern nichts anderes als Eihülle ist, kann der obige Befund bei den Ratteneiern als Beweis für die Polyspermie nicht betrachtet werden. Es scheint daher die monosperme Befruchtung für die Säugetiereier eine allgemein gültige Erscheinung zu sein.

Wodurch eine monosperme Befruchtung beim Säugetierei gewährleistet wird, wissen wir noch nicht. PINCUS und ENZMANN (1932) vermuten, daß der perivitelline Raum zu eng sei überzählige Spermatozoen „den Kopf voran“ an das Ei zur Penetration anstoßen zu lassen, was rein mechanischerweise vor Polyspermie schütze. Das trifft aber nicht zu, weil der Eintritt der Spermatozoen bei Besamung *in vitro* von jedem Punkt der Eioberfläche sogar von den der Eihülle

ziemlich dicht liegenden Abschnitten erfolgt (Taf. 22, Abb. 1). Auch die für Echinodermeneier gemachte, klassische Erklärung, daß sobald das erste Spermatozoon das Ei erreicht, die Bildung einer Membran (Befruchtungsmembran) in der Eizelle erfolgt und das Eindringen der nachträglich zu gelangenden Spermatozoen dadurch auf mechanischer Weise verhindert wird, ist hier nicht verwendbar, weil das reife Kaninchenei schon vor der Befruchtung eine eigene Zellmembran besitzt und keine weitere Membranbildung erfährt. Durch zahlreiche, mit Kaltblütereiern vor allem mit isolecithalen Eiern gemachte Experimente sind wir schon ermittelt, daß der monosperme Mechanismus von der Zustandsveränderung des Ooplasmas abhängig ist und die Bildung der Befruchtungsmembran als Folge dieser Plasmaveränderung sich manifestiert, wenn sie auch als Hindernis für überzählige Spermatozoen leisten kann, und ferner, daß das zunächst Ei gelangte Spermatozoon einen Reiz ausübt, der fast momentan ins Ooplasma ausbreitet, um dies befruchtungsunfähig zu machen, (vgl. „Wave of negativity“ von JUST, 1919).

Zur Erklärung des monospermen Mechanismus beim ebenfalls isolecithalen Säugetierei wäre die einfachste Annahme daher die, daß das zunächst ins Ei eingedrungene Spermatozoon einen chemischen Stoff bildet, der ins Ooplasma rasch diffundiert und Zellmembran erreichen kann; er kann direkt auf die nachträglich einzugehenden Spermatozoen hemmend einwirken oder zunächst die Zellmembran beeinflussen, deren Veränderungen erst sekundär für die überzähligen Spermatozoen undurchlässig machen.

Es fragt sich nun, warum das monosperme Kaninchenei bei der künstlichen Besamung *in vitro* der starken Polyspermie unterworfen wird. Auf Grund der zahlreichen Beobachtungen bei Kaltblütereiern, bei denen die pathologische Polyspermie sehr oft vorkommt, beschreibt WALDEYER (1906, S. 425) über ihre Ursache zusammenfassend: „Wenn die Eier irgendwie geschwächt sind: durch längeres Warten auf die Befruchtung, ungünstige Medien, Zusatz abändernder Reagentien, Chloroformieren u. a., dann treten auch in monosperme Eier mehrere Spermien ein“. Da bei unseren Besamungsversuchen mit Kaninchenei *in vitro* derartige Ei schwächenden Umweltfaktoren wie längeres Warten auf die Befruchtung, ungünstige Medien, vor allem Sauerstoffmangel usw. nicht ausgeschlossen sind, könnte man auch für die Ursache der Polyspermie des Kanincheneies z. T. Analogieschluß ziehen. Unerklärlich bleiben immer noch die Befunde im Fall 6 und 7. Hier unterlagte die Eizelle der zweiten Reifungsteilung und produzierte zweite Polzelle. In der Eizelle hatten sich Eikern und Spermakerne gebildet; die beiden Geschlechtskerne, die in beträchtlichem Maße anwachsen, aggregieren in der Eimitte gegen-

einander, als ob sie zur Kopulation angenähert wären. Das ganze Verhalten der Reaktionen in der Eizelle ist genau dasselbe wie bei der monospermen Befruchtung *in vitro* (vgl. Fall 4 u. 5).

Durch Analyse der physiologischen Polyspermie im vollständig durchgeschnürten und hantelförmig eingeschnürten *Triton*-Ei hat FANKHAUSER (1925) drei chemische Faktoren angenommen, die zwischen Eikern und Spermakern existieren und für die Formbildung der beiden Geschlechtskerne maßgebend sind: 1. Einen zunächst von SPEMANN (1914) bewiesenen hemmenden Faktor, der vom Hauptspermakern und später vom Furchungskern und seinen Abkömmlingen ausgeht, und die Entwicklung der Nebenspermakerne unterdrückt, 2. einen beschleunigenden Faktor der vom Eikern ausgeht und überhaupt die Entwicklung der Spermakerne hervorruft, auch zugleich den diesem am nächsten gelegenen Spermakern zum Hauptspermakern macht, und 3. eine Anziehungskraft, die zwischen den beiden Geschlechtskernen besteht und zur Kernverschmelzung führt.

Inwieweit sich die hier in Betracht kommende abnorme Polyspermie des Kanincheneies mit der physiologischen Polyspermie des *Triton*-Eies eine Parallele ziehen läßt, ist nicht leicht festzustellen. Sollten aber die Entwicklung und Kopulation der beiden Geschlechtskerne auch bei der Befruchtung des Kanincheneies bestimmte Stoffbildung in Anspruch nehmen, so können wir Polyspermie des Kanincheneies nicht immer als Reaktion des lebensschwachen Eies auffassen; es kann Polyspermie auch im lebensaktiven Ei in Erscheinung treten.

Eine wichtige Stütze für diese Auffassung liefert nun die Befruchtung der zweiten Polzelle. Wie schon bei der Lebendbeobachtung der normalen Befruchtung geschildert, können die in Polkammer eingedrungenen Spermatozoen beim Hin- und Herschwimmen an die Polzellen stoßen. Die Polzellen haben daher ebenso viele Gelegenheiten zur Befruchtung wie das Reifei. Trotzdem können die Spermatozoen im Normalfall weder in die erste noch in die zweite Polzelle eintreten. Die bisher allgemein verbreitete Annahme, daß die Polzellen wegen ihrer Winzigkeit Spermatozoen nicht eindringen lassen, ist beim Kaninchen nicht stichhaltig, weil selbst die kleinere zweite Polzelle im Vergleich mit der Größe des Spermakopfes einen viel größeren Umfang hat (vgl. Spermakopf in Textabb. 2 mit der zweiten Polzelle in Textabb. 4). CONKLIN (1915) ließ *Crepidula*-Eier durch Anwendung der Zentrifugalkraft in zwei gleich große Tochterzellen teilen, ein Reifei und eine Riesenpolzelle, welche letztere je nach der Operationszeit erste oder zweite Polzelle sein konnte. Er fand dabei, daß das Spermatozoon nur ins Reifei hineinging, während es in der

Riesenpolzelle immer fehlte. Da das Spermatozoon bei *Crepidula* vor der ersten Reifungsteilung ins Ei eindringt, erklärt CONKLIN die Ursache der Unfähigkeit der Polzelle zur Befruchtung dadurch, daß, wenn das Spermatozoon vor der Abschnürung der ersten Polzelle ins Ei eintritt, sowohl die Polzelle als auch die nachträglich vom Ei gebildeten anderen Zellen gegen andere Spermatozoen „immunisiert“ sind. Demnach kann man auch beim Kaninchen, bei dem die Abstoßung der zweiten Polzelle erst nach dem Eintritt des Spermatozoon in die Eizelle erfolgt, die Befruchtungsunfähigkeit der zweiten Polzelle dadurch erklären, daß ihr Zytoplasma ebenso wie dasjenige ihrer Mutterzelle schon für die nachträglich einzudringenden Spermatozoen immunisiert ist.¹⁾

Besamen wir nun diese gegen Spermatozoen immun gewordene zweite Polzelle *in vitro*, so läßt sie sich ein oder mehrere Spermatozoen eintreten; es kommt sogar Spermakernbildung zustande. Andererseits werden ihre Chromosomen in den ruhenden Kern, Polkern, umgebildet, was im Normalfall nicht vorkommt.²⁾ Polkern und Spermakerne können weiter gegeneinander verschmelzen, so daß ein polyploides Synkaryon entstehen könnte. Es handelt sich also keineswegs um eine Reaktion der geschwächten Polzelle sondern um eine Reaktion der aktivierten Polzelle, die sonst nicht reaktionsfähig ist. Die mono- und polysperme Befruchtung der zweiten Polzelle ist demnach im Prinzip mit der polyspermen Befruchtung der Eizelle gleich und lassen sich der Zerstörung des monospermen Mechanismus zurückführen.

Wenn wir nun nach den Ursachen der polyspermen Befruchtung der Eizelle und der mono- und polyspermen Befruchtung der zweiten Polzelle fragen, die nur bei der künstlichen Besamung *in vitro* in Erscheinung treten, so fällt unser Auge vor allem auf die direkte Besamung mit sehr dicker Spermasuspension, vorausgesetzt, daß diese auffallende Erscheinungen keine Reaktionen auf die zellabschwächenden Umweltfaktoren darstellen. Es ist bei einigen Kaltblütern wie Frosch, Seeigel usw. wohl bekannt, daß man nur durch Besamung mit übermäßig dickem Sperma Polyspermie herbeiführen kann (WILSON 1928, S. 418). Es kommt also bei der Zerstörung des monospermen Mechanismus in der Eizelle die Quantität der Spermatozoen in Frage.

1) Die Unfähigkeit der ersten Polzelle zur Befruchtung, die schon vor dem Eindringen des Spermatozoon von der Oozyte II. Ordnung abgeschnürt deshalb gegen Spermatozoon noch nicht immunisiert ist, kann wohl auf die andere Beschaffenheit des Zytoplasmas beruhen. Diese Frage lasse ich jedoch vorderhand dahingestellt.

2) SOBOTA und BURCKHARD (1910) teilen auch mit, daß bei der Ratte die zweite Polzelle niemals einen Ruhekern bildet.

In der II. Mitteilung dieser Studien (1935 b) habe ich schon nachgewiesen, daß das Spermatozoon bestimmte leicht extrahierbare chemische Substanzen wahrscheinlich Tryptasen enthält, die imstande sind, das Zytoplasma sowohl der Eizelle, der Follikelzellen und der Coronazellen als auch die Eihülle aufzulösen, und ferner, daß die betreffenden Substanzen je nach der Dosis auf die Eizelle bald zytolytisch bald zellaktivierend einwirken können. Es ist daher leicht anzunehmen, daß bei direkter Besamung mit sehr dickem Sperma diese proteolytischen Substanzen in hohem Maße dem Ei hinzugefügt werden und das Durchgehen der außerordentlich vieler Spermatozoen durch die Coronazellen und Eihülle erleichtert werden, um weiter in den perivitellinen Raum einzutreten. Die Folge davon ist, daß die an die Eioberfläche gelangten Spermatozoen einen zytolytischen Einfluß vorerst auf die Zellmembran ausüben, wodurch der monosperme Mechanismus durchaus zerstört wird. Somit können die überzähligen Spermatozoen ohne Schwierigkeit in die Eizelle penetrieren. Dasselbe Verhalten kann man auch für die mono- und polysperme Befruchtung der schon gegen das Spermatozoon immunisierten zweiten Polzelle annehmen. So reduziert sich die Frage nach der polyspermen Befruchtung der Eizelle und der mono- und polyspermen Befruchtung der zweiten Polzelle auf die Frage nach der proteolytischen Wirkung der Spermatozoen. Selbstredend verhalten sich die Reaktionsbilder hier etwas anders als bei der Einwirkung des Samenextraktes, da das Spermatozoon noch andere Wirkungen haben muß, die vorderhand vernachlässigt werden können.

VI. Schluß

Das Kaninchenei vielleicht Säugetierei im allgemeinen ist unter normalen Verhältnissen monosperm. Der Mechanismus dafür ist auf Grund der Befunde der isolecithalen Kaltblütereiern wahrscheinlich so zu erklären, daß das zunächst ins Ei eingedrungene Spermatozoon einen chemischen Stoff bildet, der ins Ooplasma rasch diffundiert, um Zellmembran zu erreichen, und diese für überzählige Spermatozoen undurchlässig machen kann. Wird das Ei aber *in vitro* besamt, so tritt starke Polyspermie auf. Da hierbei eine große Menge der Spermatozoen direkt auf das Ei einwirkt, und jedes Spermatozoon proteolytische Substanzen enthält, dann muß die einmal gegen andere Spermatozoen „immunisierte“ Zellmembran stark beeinflusst werden, sodaß überzählige Spermatozoen leicht ins Ei durchgehen können. Die zweite Polzelle, die erst nach dem Eindringen des Spermatozoon ins Ei abgestoßen wird, sollte der obigen Annahme nach gleichzeitig mit ihrer Mutterzelle immunisiert, d.h. nicht mehr befruchtungsfähig sein. Trotzdem wird diese Polzelle bei der Besamung *in vitro* mono-

oder polysperm befruchtet, was wieder der proteolytischen Wirkung der Spermatozoen zurückgeschrieben werden kann.

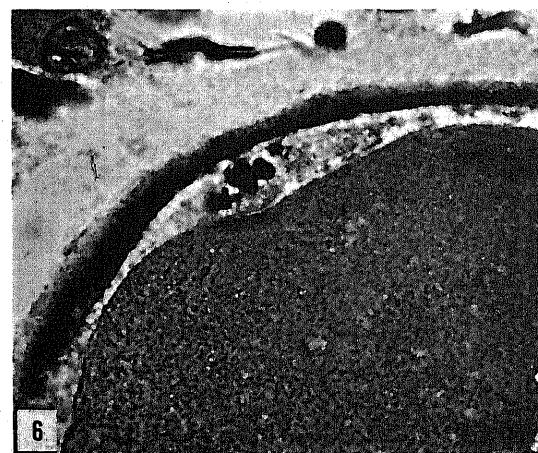
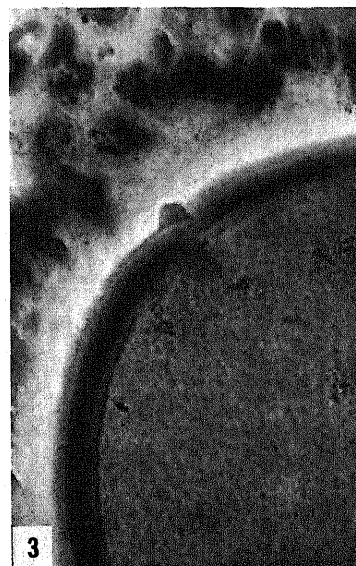
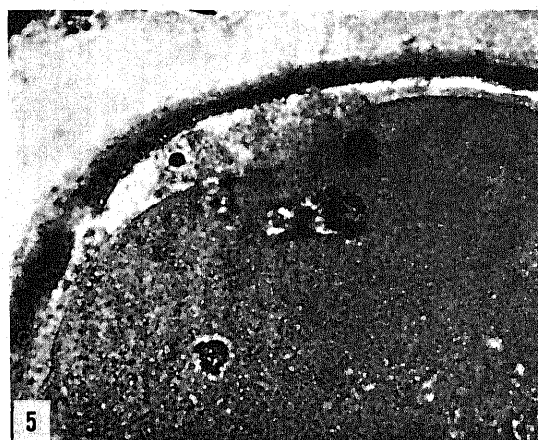
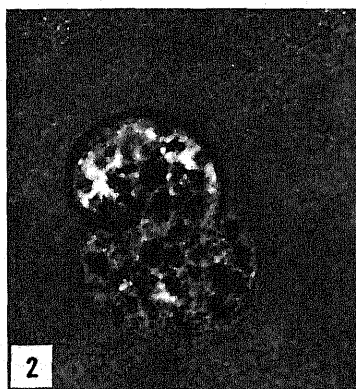
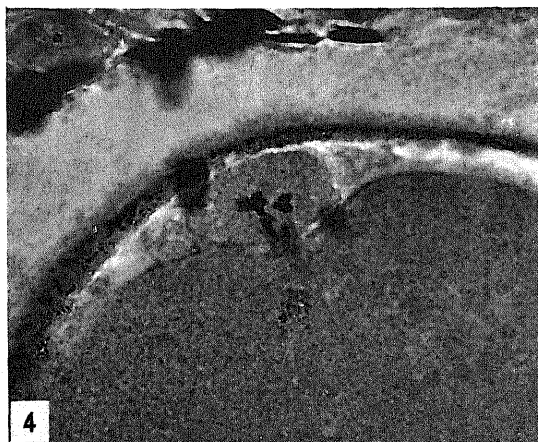
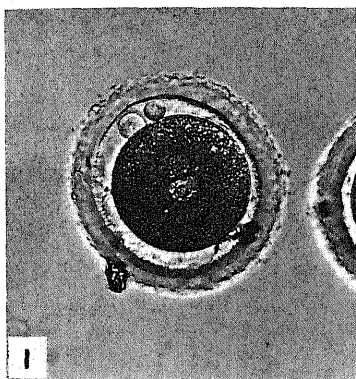
VII. Literaturverzeichnis

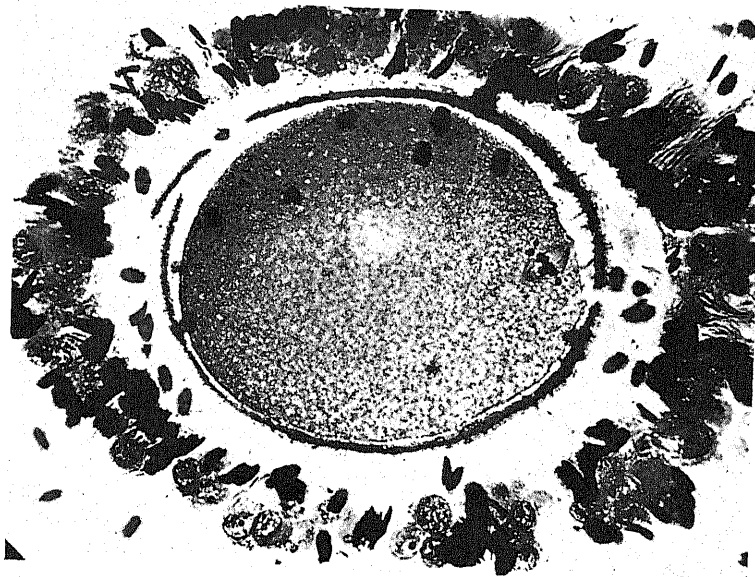
- Conklin, E. G., Why polar bodies do not develop? Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 1, 1915.
- Fankhauser, G., Analyse der physiologischen Polyspermie des *Triton*-Eies auf Grund von Schnürungsexperimenten. Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. 105, 1925.
- Just, E. E., The fertilization reaction in *Echinarachnius parma*. I. Biol. Bull. Vol. 36, No. 1, 1919.
- Kirkham, W. B., The maturation of the mouse egg. Biol. Bull. Vol. 12, No. 4, 1907.
- Kremer, J., Das Verhalten der Vorkerne im befruchteten Ei der Ratte und der Maus mit besonderer Berücksichtigung ihrer Nucleolen. Zeitschr. f. mikrosk.-anat. Forsch. Bd. 1, 1924.
- Lams, H., Etude de l'oeuf de Cobaye aux premier stades de l'embryogénese. Arch. de biol. T. 28, 1913.
- u. Doorme, G., Nouvelles recherches sur la maturation et la fécondation de l'oeuf des mammifères. Arch. de Biol. T. 23, 1907.
- Pincus, G. u. Enzmann, E. V., Fertilization in the rabbit. Jour. Exp. Biol. Vol. 9, No. 4, 1932.
- u. — The comparative behavior of mammalian egg *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. Jour. Exp. Med., Vol. 62, No. 5, 1935.
- Rubaschkin, W., Über die Reifungs- und Befruchtungsprozesse des Meerschweinchens. Anat. Hefte. Bd. 29, 1905.
- Sobotta, J. u. Burckhard, G., Reifung und Befruchtung des Eies der weißen Ratte. Anat. Hefte. Bd. 42, 1910.
- Spemann, H., Über verzögerte Kernversorgung von Keimteilen. Verhandl. d. deutsch. zool. Ges. a.d. 24. Jahresvers. Freiburg i. Br. 1914.
- van der Stricht, O., Le spermatozoïde dans l'oeuf de chauvesouris (*Vesperugo noctula*). Verhandlg. Anat. Gesellsch. Halle 1902.
- Waldeyer, W., Die Geschlechtszellen. Handb. d. vergl. u. exp. Entwicklungslehre d. Wirbeltiere. Bd. 1, Teil. 1, 1906.
- Wilson, E. B., The cell in development and heredity. New York. 1928.
- Yamane, J., The proteolytic action of mammalian spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. Cytologia, Vol. 1, No. 4, 1930.
- Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. I. Die Dispersion der Follikelzellen und die Ab'lösung der Zellen der Corona radiata des Eies durch Spermatozoen. Cytologia, Bd. 6, Nr. 2-3, 1935(a).
- Dieselbe Studien. II. Die Isolierung der auf das Eizytoplasma auflösend wirkenden Substanzen aus den Spermatozoen. Cytologia, Bd. 6, Nr. 4, 1935(b).

VIII. Tafelerklärung

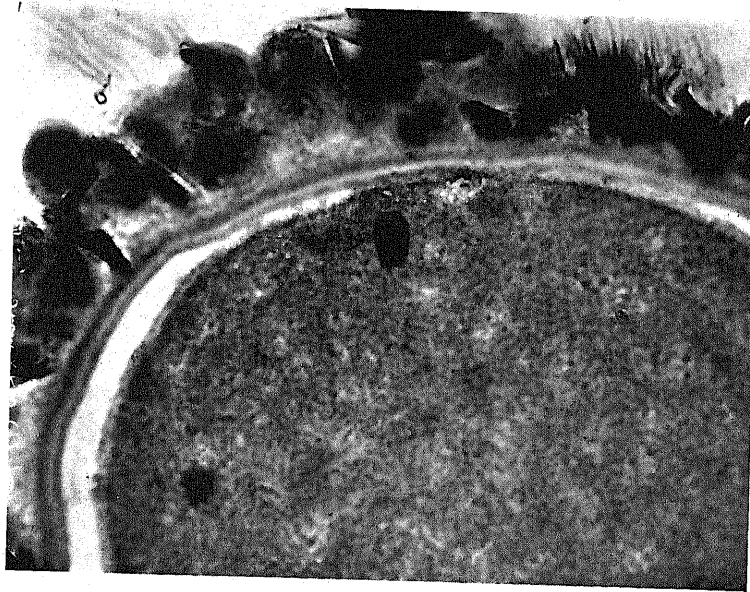
Taf. 21 (Abb. 1-6)

- Abb. 1. Optischer Schnitt durch die Mitte eines *in vivo* normal befruchteten Kanincheneies (TE 312) bei der Lebendbeobachtung (15 Stunden post coitum). Im perivitellinen Raum befinden sich eine erste und eine zweite Polzelle. In der Eimitte, und zwar im Hof dotterarmen Ooplasmas, sind ein Eikern und ein Spermakern in Vereinigung begriffen (vgl. Abb. 2). Vergr. 166×.
- Abb. 2. Schnitt durch den Ei- und Spermakern in Verschmelzung (TE 283; 20 Stunden post coitum). Vergr. 1,100×.
- Abb. 3. Schnitt durch die Peripherie eines *in vitro* besamten Tubeneies (TE 163). Ein Spermakopf ist im Eindringen in die Eihülle begriffen; Mittelstück und Schwanzfaden fehlen gänzlich; die Spermazentrosomen unsichtbar. Vergr. 550×.





1



2

Yamane: Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. III

Abb. 4, 5 und 6. 3 Serienschritte durch ein *in vitro* besamtes Tubenei (TE 201). Das Ei zeigt das Telophasestadium der zweiten Reifungsteilung. Die zweite Polzelle ist ellipsoidisch (Abb. 4), die dritte Polzelle mit einem Chromosomenklumpen ist rundlich (Abb. 5) und die erste Polzelle ist schon stark abgeplattet (Abb. 6). Ein Spermakopf lagert sich im Ooplasma dicht neben der Tochterchromosomen der Eizelle (Abb. 5). Man vergleiche eine Rekonstruktion in Textabb. 3. Vergr. 1,100×

Taf. 22 (Abb. 1 u. 2)

Abb. 1. Axialer Schnitt durch ein *in vitro* besamtes Tubenei (TE 203). Im Ooplasma zählt man schon 6 Spermaköpfe, während einer noch im Eintritt begriffen ist; rechts liegt die zweite Polarspindel. Man beachte starken Schwarm der Spermatozoen um das Ei. Vergr. 550×

Abb. 2. Schnitt durch ein *in vitro* besamtes Tubenei (TE 193). An der Peripherie des Ooplasmas lagert sich ein Spermakopf, der nach dem Eintritt eine Umdrehung um 180° erfahren hat. Hier fehlen auch Mittelstück und Schwanzfaden. Vergr. 1,100×

Chromosome Numbers in the European Grape (*Vitis vinifera*)

By

H. P. Olmo

University of California, Davis, California

Introduction

Two chromosome numbers have been reported in the species *Vitis vinifera*: $n = 19$ and $n = 20$. Most authors consider that the correct number is 19 and that the occasional reports of a higher chromosome number in some varieties are erroneous, since the chromosomes are very small and difficult to count. Husfeld's discovery (1932) of two seedlings from a selfed progeny of the cultivated variety Moselle Riesling, having 40 somatic chromosomes, has again raised the question as to whether the species *vinifera* includes varieties with hyperploid numbers.

The present survey was undertaken to determine whether cultivated *vinifera* varieties were characterized by differences in chromosome number. It seemed possible that variations in chromosome number might be partly responsible for the high intraspecific variability—well over 5,000 varieties have been described. Clones with variant chromosome numbers would be easily perpetuated by the asexual method of propagating the *vinifera* vine, practiced since time immemorial.

Review of literature

Dorsey (1914) reported the Barry, Brighton, and Concord to have a haploid chromosome number of 20. The Barry and Brighton were known to be hybrids of *V. labrusca* \times *V. vinifera*, whereas the Concord was assumed to be a *V. labrusca* type. The deduction was made that the species *vinifera* would therefore be expected to have $n = 20$. Wellington (1932) now ranks the Concord as a *labrusca* \times *vinifera* hybrid. Ghimpu (1927) determined the somatic number of 38 for *V. vinifera*; but he did not mention the variety or varieties with which he worked. This number was confirmed by Nebel (1928–29) in the varieties Muscat of Alexandria and Sultanina.

In 1929, Kobel, Sax, and Hirayanagi each reported the numbers $n = 19$ or $2n = 38$. Kobel found 19_{II} at meiotic metaphase in the varieties Blauer Burgunder, Grüner Sylvaner, Gutedel, and Muller-Thurgau. Microsporogenesis was normal. Sax listed the Charboro (probably Charbono?), Muscat Hamburg, Chasselas ciotat, and Cinsaut as having 38 somatic chromosomes; but a deviation was noted

in a *vinifera* variety, obtained from China, that apparently had 40 chromosomes. Hirayanagi determined the haploid number of six cultivated *vinifera* varieties in Japan to be 19. Negrul (1930) reported varieties from each of four countries. The French varieties Chasselas rose, Grand noir, and Malaga bleu; the English variety Muscat Hamburg; the Bassarabian varieties Plavai, Serectia, and Alemtchak; and the Caucasian varieties Otzhanure Lapere, Rka tzitel (Kutais), Rka tzitel (Kahetia) were all $n = 19$ or $2n = 38$. Branas (1932) found the haploid number 19 in four *vinifera* varieties.

Results contrary to those given above are noted by Iwanowa-Parouskaja (1929), who stated definitely that the haploid number of the middle Asian variety Charas was 20. Husfeld (1932) also listed two seedlings of a selfed progeny of the cultivated variety Moselle Riesling with 40 somatic chromosomes, an indication that the parental clone is hyperploid.

As Kobel (1929) and Negrul (1930) have pointed out, the earlier results of Dorsey (1914) and Iwanowa-Parouskaja (1929)—namely, that $n = 20$ —may well be attributed to errors in counting, since these workers were mainly concerned with other phases of flower structure and morphology and made no special study of the chromosome situation. But the further mention of a 40-chromosome *vinifera* form by Sax (1929) and again by Husfeld (1932) is evidence that at least some *vinifera* varieties may be hyperploid. The number 38 may be inconstant.

Methods

Two types of material were employed in this study: (1) Root tips from cuttings of each variety were used to determine the chromosome number of the clone. (2) One or two seedlings of each diploid variety were selected at random from selfed progenies, and their chromosome numbers determined. The use of seedlings serves as a partial check of the predetermined numbers but—more important—gives us some perspective of the relative stability of the chromosome number in the sexually reproduced plants.

The chromosome numbers of all varieties were obtained by counting somatic plates of the root tips. Cuttings of well-matured canes from 3 to 4 nodes in length were stratified in a mixture of coarse sawdust and charcoal, packed in the usual type of box employed for callusing bench-grafted vines. Lining the inside of the box with sphagnum moss prevented drying out, so that after the boxes had once been immersed in water for several hours, no further watering was required. The boxes were placed in a heated greenhouse or callusing room. In two to three weeks the roots had developed sufficiently. Satisfactory results were obtained by using the tips of

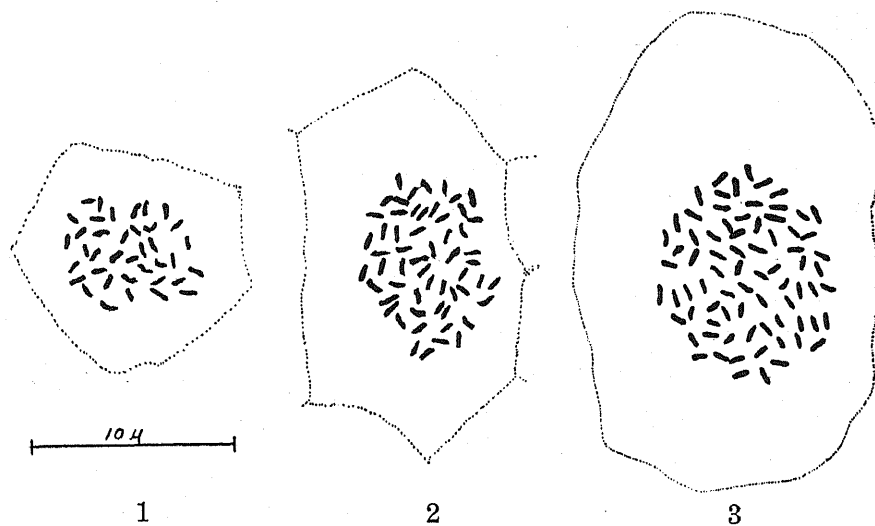
roots that had developed from 1/4 to an inch in length. At this stage they are more easily separated from the stratifying medium without breakage when the cutting is removed, and division figures are plentiful. Root tips of seedling vines were obtained from potted plants about one month old.

Killing and fixing was done with Karpechenko's fluid. Root tips infiltrated with paraffine, after the use of either Dioxan or the usual alcohol and xylene series, were satisfactory. Difficulties in infiltration occurred with one lot of material from using Dioxan that was not sufficiently dehydrated. The material was sectioned at $10\ \mu$ and stained with Newton's gentian violet-iodine method, as Husfeld (1932) had reported that hematoxylin stains were not satisfactory.

The somatic chromosomes

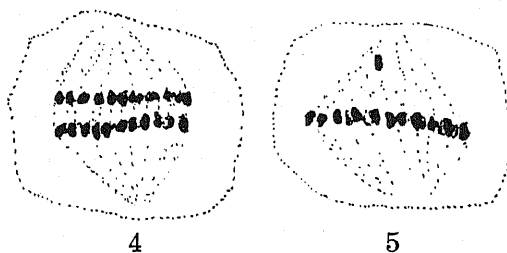
The somatic chromosomes are very small, averaging about one micron in length. This figure agrees with the results of Negrul (1930), and Husfeld (1932). Ordinarily they appear as short, symmetrical, rod-shaped bodies, a fact indicating that the attachment regions are terminal. It would be premature to lay much emphasis on the occasional appearance of chromosomes that are noticeably larger or which appear to show a difference in morphology from other members of the genom. The variation due to fixation may be considerable, and the uniformly small size of the chromosomes makes it extremely difficult to draw conclusions on their relative size and morphology.

The chromosomes of the very meristematic area of the root tip are larger, thicker, and inclined to overlap more than those present in the more mature cells somewhat removed from this area. The best plates for counting purposes are in the region posterior to the meristematic apex. In the large peripheral cells the chromosomes are more drop-like and are well separated at metaphase. Since members of a pair have little tendency to show any parallel orientation, one can seldom distinguish homologous chromosomes from their position on the plate (Figs. 1, 2, 3). Nebel (1928-29) has reported the Muscat of Alexandria to have 4 satellited chromosomes (only 3 in one report, 1929); but he could find only six in the autotetraploid Muscat of Alexandria gigas, where eight were expected. Although small, pin-point satellites have been observed in some well-stained preparations, they are so near the limits of microscopic resolution and can be seen so infrequently that no definite number of them can be established. Never have more than two been observed in the same diploid plate at metaphase.



Figs. 1-3. 1. Metaphase plate of the diploid variety Petit Verdot, $2n = 38$. 2. The autotriploid of Quagliano, $3n = 57$. 3. The autotetraploid Sultanina gigas, $4n = 76$.

The somatic divisions proceed with striking regularity. Separation of the chromosomes takes place simultaneously, and their movement to the poles of the achromatic figure is well coordinated (Fig. 4). The only type of aberrant behavior observed was an occasional failure of chromosomes to align on the metaphase plate. Of 400 plates of all varieties examined in side view, about 5 per cent had one, 4 per cent had two, and less than 1 per cent had three chromosomes that failed to become oriented (Fig. 5).



Figs. 4, 5. 4. Typical side view at early anaphase. 5. Side view of a metaphase plate, showing an unoriented chromosome on the spindle.

Diploids

All the 84 cultivated *vinifera* varieties chosen for study were found to be diploid, $2n = 38$ (Table 1). Most of the varieties listed are important wine, raisin, or table grapes in California. As practically all were introduced from Europe during the last 150 years, the present list of varieties is a fair sample of all the cultivated *vinifera* in the world. No consistent differences in chromosome number, size, or morphology could be detected between varieties. The somatic divisions were regular.

Since the seedless varieties Sultanina, Sultana, Monukka, Black Corinth, and White Corinth have a normal diploid number of 38, abnormal chromosome numbers cannot be advanced as a cause of seedlessness in these varieties. The phenomenon of coulure—the excessive shedding of the flowers soon after blossom—present in such varieties as Clairette blanche, likewise cannot be attributed to abnormal chromosome numbers.

Table 1. Chromosome numbers of *vinifera* grape varieties

Diploids (2n = 38)		
Aleatico	Diamond Jubilee	Nebbiolo fino
Alicante Bouschet	Dizmar	Negrara di Gattinara
Angulata	Emperor	Olivette blanche
Aramon	Feher Szagos	Pagadebito
Barbera	Frankenthaler	Palomino blanco
Beclan	Furmint	Petite Sirah
Bellino	Gamay Beaujolais	Petit Bouschet
Black Corinth	Grand noir	Petit Verdot
Black Hamburg	Green Hungarian	Pinot St. George
Black Morocco	Grenache	Quagliano
Bolgnino	Gros Colman	Rambola
Burger	Gros Manzenc	Semillon
Burgrave	Malaga (Panse de Rocque- vaire)	Serine
Carignane	Malbec	Servant
Catarratto	Malvasia bianca	St. Emillion
Cornichon (Olivette noire)	Mission	St. Macaire
Chasselas doré	Marvel de Vaucluse	Sultana (Austrian Seed- less)
Chasselas Florence	Mondeuse	Sultanina (Thompsons Seedless)
Chasselas Montauban	Monica	Sylvaner
Chasselas musqué vrai	Monukka	Tannat
Chasselas Négrepont	Moscato di Terracina	Teinturier
Chasselas rose royal	Mourastel	Valdepénas
Chenin blanc	Mourisco preto	Van der Laan
Cinsaut	Meunier	White Corinth
Clairette blanche	Muscadelle du Bordelais	Zabalkanski
Coudsi	Muscat a fleur d'orange	Zinfandel
Crabbes Burgundy (Re- fosco)	Muscat of Alexandria	
Damas Rose	Muscat St. Laurent	
Danugue	Nebbiolo	
Tetraploids (4n = 76)		
Cornichon gigas	Sultanina gigas	Tokay gigas
Muscat of Alexandria gigas		
Triploids (3n = 57)		
Muscat of Alexandria ♀ × Sultanina gigas ♂, seedling. Quagliano seedling		

Deviations in chromosome number, though not present in the clones examined, may become evident if chromosome distribution during the meiotic divisions is irregular. But of 129 seedlings chosen at random from selfed progenies of 79 varieties listed as diploids, only one was found that did not have 38 somatic chromosomes. This was a triploid. According to the results, the somatic number of 38 is a stable one and may be taken as the true diploid number of the species *V. vinifera*.

Tetraploids

Somatic doubling of the chromosome number is known to occur spontaneously in several varieties (Olmo, 1936). Either such autotetraploid forms are discovered as single mutated arms or canes on an otherwise normal vine, or entire vines may exhibit gigantic features. The origin of whole mutant vines may usually be traced to the unintentional propagation of preexisting tetraploid buds or canes in the vineyard.

The gigas form of the Sultanina, the only tetraploid tried in commercial plantings, has not won acceptance, mainly because of its irregular bearing habit. This defect is also serious in other gigas varieties of the grape.

Tetraploid mutations of the following varieties have thus far been discovered as bud sports and propagated at the California Experiment Station: Sultanina (Thompson's Seedless), Muscat of Alexandria, Tokay, and Olivette noir (Cornichon). Bioletti (1918) first described an enlarged type of Sultanina. Previous to this time, the same author mentioned giant forms of the Muscat of Alexandria, Tokay, and Zinfandel. From material furnished by Bioletti, Nebel (1928-29) first established the tetraploid nature of both the Sultanina gigas and the Muscat gigas, reporting each to have 76 chromosomes. The author has confirmed these results (Fig. 3) and finds the double chromosome number in the other gigas forms mentioned in Table 1.

Triploids

By crossing Muscat of Alexandria ♀ × Sultanina gigas ♂, a hybrid triploid plant has been obtained. Diploid pollen grains may therefore be functional. In appearance the plant is intermediate, being more robust than the diploid but less enlarged than its tetraploid parent. Unfortunately, like some seedlings that appear in diploid populations, it has as yet failed to form fruit buds or blossom clusters.

An autotriploid seedling of the variety Quagliano having 57 chromosomes (Fig. 2) was the only plant found that was not diploid in the 129 seedlings examined from selfed diploid parents. An unreduced egg or pollen grain was functional in this instance. The seedling has not yet reached bearing age.

Discussion

Negrul (1930) stated that the apparent contradiction between the reported haploid numbers of $n = 19$ and $n = 20$ might have the following causes: (1) Some varieties have unlike chromosome

numbers. (2) "Female" grape varieties have an extra chromosome pair. (3) The true chromosome number could be either 19 or 20. After reviewing the work of Nebel, Kobel, and Hirayanagi, and finding them in accord with his own determinations, Negrul stated that the number $n = 20$ was incorrect and that the haploid number was 19.

There is ample evidence that the early report of Dorsey (1914) with the *vinifera* \times *labrusca* hybrids was a misinterpretation, since subsequent work on some of the same hybrid varieties (for example, Hirayanagi, Nebel, et. al.) report $n = 19$, $2n = 38$. Like Dorsey, Iwanowa-Parouskaja (1929) was mainly interested in the general study of male sterility in grape varieties; and here again we might be dealing with an erroneous report. The possibility is still present that an occasional clone may have extra chromosomes, but this situation appears to be rare in cultivated varieties. Sax (1929) could not be certain of the somatic number of 40 in a *vinifera* variety that he examined; here, again, little can be said of this apparent exception to the normal diploid number 38.

Husfeld, however, has given ample proof that some seedlings of the Moselle Riesling have 40 somatic chromosomes. The variety itself is perhaps hyperploid. Further investigation will be necessary to determine the parental chromosome number. Some aberration during somatogenesis, like that previously described, may explain how such a hyperploid clone could arise. If two chromosomes, A and B, are left off the metaphase plate before separation of the chromatids occurs, then the distribution of chromosomes to each pole is unequal in number, since only 36 are aligned on the plate. Thirty-six chromosomes will then move to each pole; but one pole will have in addition four chromosomes, the two strays having since divided. One new cell will therefore have 40 chromosomes, including $3A + 3B$ chromosomes; the other will contain only 36. The hyperploid cell, not being deficient, would continue to develop and produce tissue with the increased chromosome number. One or two trivalents should be found during meiotic metaphase if the original unoriented chromosomes were non-homologous, whereas an occasional quadrivalent would indicate that the acquired extra chromosomes were homologues.

The regularity of chromosome behavior and the constancy of chromosome number in *vinifera* varieties would argue against any recent hybridity being concerned in their origin. Differentiation within the species has apparently occurred by accumulation of many genic differences, rather than by gross changes in chromosome structure or number.

Summary

1. A review of the literature indicates that two chromosome numbers have been given for *Vitis vinifera*: $n = 19$ and $n = 20$.
2. The somatic chromosome number of 86 cultivated varieties has been found to be 38.
3. Of 129 seedlings grown from self-pollinated seed of many diploid varieties, all had the normal number 38, except one that was triploid.
4. The chromosome number of *Vitis vinifera* is $n = 19$, $2n = 38$. Rarely may clones be propagated that have a hyperploid number. A theory is presented to account for their origin from normal diploids.
5. Seedlessness and coulure, as manifested in some varieties, cannot be attributed to a heteroploid chromosome constitution.
6. The origin of triploid and tetraploid derivatives is described.
7. Intraspecific variation has occurred mostly by the accumulation of genic differences, without gross alteration in chromosome number or structure.

Literature cited

- Branas, M., 1932. Recherches caryologiques sur la vigne. Ann. Ecole Nat. Agric. Montpellier, 22 (1): 5-12.
- Dorsey, M. J., 1914. Pollen development in the grape with special reference to sterility. Univ. Minn. Agr. Exp. Sta. Bul., 144.
- Ghimpu, M. V., 1927. Recherches chromosomiques sur les luzernes, vignes, chenes et orges. 14th Internat. Congrès d'Agriculture. Bucharest, 4.
- Hirayanagi, H., 1929. Chromosome arrangement. III. The pollen mother cells of the vine. Mem. Col. of Sc. Kyoto Imp. Univ., 4: 273-281.
- Husfeld, Bernhard, 1932. Über die Züchtung plasmoparawiderstandsfähiger Reben. Gartenbauwiss., 7: 15-92.
- Iwanowa-Parouskaja, 1929. Weibliche Rebenblüte. Proc. of Genetics Congress, Leningrad.
- Kobel, F., 1929. Die cytologische und genetische Voraussetzung für die Immunitätszüchtung der Rebe. Züchter, 1, H. 7.
- Nebel, B., 1928-29. Zur Cytologie von *Malus* und *Vitis*. Gartenbauwiss., 1: 549-592.
- Nebel, B., 1929. Chromosome counts in *Vitis* and *Pyrus*. Amer. Nat. 63: 188-189.
- Negrul, A. M., 1930. Chromosomenzahl und Charakter der Reduktionsteilung bei den Artbastarden der Weinrebe (*Vitis*) Züchter, 2, H. 2.
- Olmo, H. P., 1936. Bud mutation in the *vinifera* grape. II. Sultanina gigas. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 33: 437-439.
- Sax, K., 1929. Chromosome counts in *Vitis* and related genera. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 26: 32-33.
- Wellington, R., 1932. The value of the European grape in breeding grapes for New York State. Proc. Sixth Int. Congress of Genetics, 2: 208-209, Ithaca, New York.

A Note on Salivary Chromosome Knots in Relation to Problems of Mutation and Chromosome Structure

By

C. W. Metz

Department of Embryology, Carnegie Institution of Washington,
and Johns Hopkins University, Baltimore, Md.

In studying the salivary gland chromosomes of *Sciara* several cases have been found in which a chromosome pair is looped upon itself so as to form a simple knot of the type shown in figures 1 and 2. Such knots exhibit certain points of general interest as indicated below.

The preparations show clearly that the structures in question are true knots—not merely loops with overlapping of the chromosomes. The knots observed thus far are also small—i.e., relatively “tight”—and lie some distance from either end of the chromosomes in question.

All the knots under consideration have been observed in “normal”

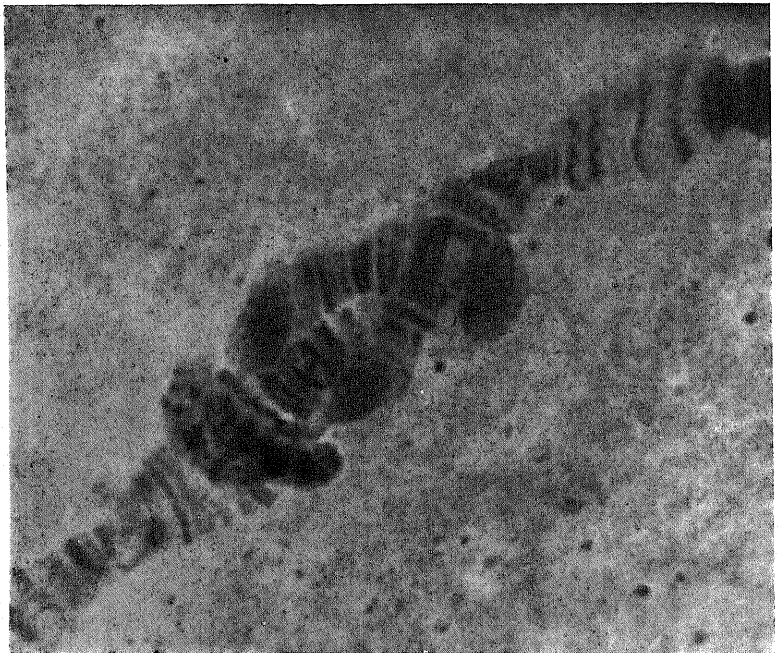


Fig. 1. Photograph of small portion of chromosome A in *Sciara ocellaris* showing the chromosome tied in a knot. From an aceto-carmin preparation of a salivary gland nucleus. See text for details.

material, which has not been subjected to artificial treatment and does not possess translocations or other chromosome rearrangements which might cause unusual configurations. Likewise, in all cases the two homologues of the pair behave as a unit. No example has been found in which one homologue is tied in a knot and the other is free from such a knot.

It seems clear that such knots as those under consideration could not have arisen from mechanical disturbance in the process of fixing and spreading the material in making the slides. The knots presumably were formed by movements of the chromosomes themselves (either induced or autonomous), and serve to illustrate the large amount of movement which chromosomes may undergo. There is no direct evidence to indicate when the knots were formed—whether at an early or a late stage in the development of the cells—but the fact that they are small or relatively “tight” tends to indicate that they arose early and became progressively “tighter” during the development and enlargement of the chromosomes. If this assumption is valid it provides an additional indication that synapsis or fusion of homologues in the salivary gland cells occurs at an early stage, because it must have preceded the formation of the knot.

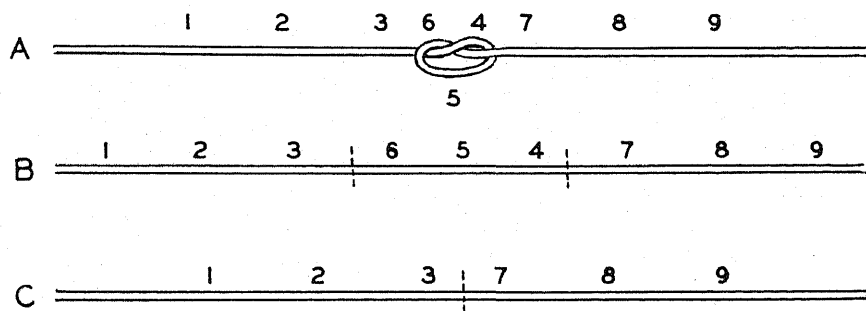


Fig. 2. Diagrams. See text for explanation.

Presumably, in forming the knot the fused pair in each case first formed a relatively large loop through which one end of the double chromosome passed. In any case, it seems clear that to form a “tight” knot, such as those observed, the two ends of the chromosome must have moved away from one another or one arm must have moved progressively through the loop. In doing this different parts of the chromosome (thread?) would be drawn into close proximity to one another and would slide over one another as the knot tightened. In no case, however, is there any evidence of fusion as a result of this proximity or contact. It seems evident that something serves to prevent fusion, or make it a rare occurrence, under ordinary condi-

tions. The lack of fusion might be due to a lack of adhesiveness of the chromosome proper; but it seems more probable that it is due to an insulating agent such as a layer of "matrix" or "sheath" material as postulated previously in other cases (Metz 1934).

The knots possess further interest in connection with the problem of chromosome rearrangements and mutation. It seems legitimate to assume that such knots may occur in cells of the germ-line as well as in those under consideration. And it seems probable that a knot as tight as these would not be undone by a straightening or untying process. Presumably it would either result in destruction of the chromosome, through failure to undergo normal mitotic behavior, or in a chromosome rearrangement giving an inversion or deletion as indicated in figures 2B and 2C respectively. The figures show only two of the various types of inversions or deletions which might result.

In accounting for small inversions, and perhaps small deficiencies, a knot would seem to provide a more effective mechanism than a simple loop, for as the knot became progressively tighter it would bring the chromosome threads into progressively more intimate union, while in the case of a simple loop the threads should tend to separate as the loop became smaller.

As intimated above, the fact that in the formation of the knot no fusion occurs as the parts of the chromosome slide over one another, even though they appear to be in close contact, suggests the presence of an insulating, non-adhesive surface layer. This serves again to raise the question considered in an earlier paper (Metz 1934) as to the possible rôle of such an insulating layer of "matrix" or "sheath" material which would tend under ordinary conditions to keep chromosome threads from coming into contact (except in homologous regions) but which might under exceptional conditions, or as a result of artificial treatment (irradiation etc.), be modified so as to permit contacts resulting in chromosomal alterations, including mutational changes.

Literature Cited

- Metz, C. W. 1934. The role of the "chromosome sheath" in mitosis, and its possible relation to phenomena of mutation. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 20: 159-163.
-

Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen einiger Pflanzen

Von

G. Yamaha

Aus dem Botanischen Institut der Tokio-Universität für
Literatur und Wissenschaft

(Mit Tafel 1 und 3 Textfiguren)

Die amphotere Natur des Protoplasmas läßt uns auf die Bedeutsamkeit der Bestimmung der freien Ladung desselben im Standpunkt der Protoplasmik schließen. Über die Ladungsverhältnisse des Protoplasmas in den sich teilenden Zellen gibt uns allerdings die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pH_i) und der Wasserstoffionenkonzentration desselben einige Aufschlüsse (YAMAHA 1935). Es wäre aber sehr erwünscht, diese Schlußfolgerung womöglich mit einer direkten Messungsmethode zu bestätigen. Zu diesem Zweck kommen vor allem die kataphoretische und die elektrometrische Methode in Betracht. In vorliegender Abhandlung beschäftige ich mich mit der erstgenannten.

Bei den kataphoretischen Versuchen verfahre ich etwa ähnlich wie bei den früheren Mitteilungen (YAMAHA u. ISHII 1933, YAMAHA u. ABE 1934). Es kommt aber hier darauf an, die kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit einzelner Strukturelemente des Protoplasmas quantitativ zu bestimmen. Dementsprechend ist die direkte bzw. Lebendbeobachtung der Kataphorese der Protoplasmastrukturen dringend nötig, was jedoch bislang nur selten gemacht wurde. Bei der Durchströmung der Elektrizität durch die Zelle ist die Wirkung des elektrischen Stromes auf Protoplasma nicht zu vermeiden, da sich das letztere der Elektrizität gegenüber äußerst empfindlich verhält. Man gedenke nur der Wirkung der Elektrizität auf die Viskosität (BERSA u. WEBER 1922), Permeabilität (BERSA 1926, SEN 1931, HÖBER 1933 usw.) des Protoplasmas, Protoplasmaströmung (UMRATH 1930 usw.) usw. Man stößt also hier auf eine kaum überwindbare Schwierigkeit. Dieser Umstand benötigt uns um so mehr der Lebendbeobachtung der Kataphorese des Protoplasten. Man muß denn sich bei jedem Versuche davon überzeugen, daß die erzielte elektrophoretische Verlegung der Strukturelemente bei der Stromausschaltung völlig reversiblerweise rückgängig wird. Wünschenswert ist dabei, die Versuche durch die aufeinanderfolgende Ein- und Ausschaltung des Stromes zu wiederholen, um zu sehen, ob jedesmal ebendieselbe kataphoretische Verlegung bzw. Wanderung

des betreffenden Strukturelementes eintritt. Um die völlig reversible Elektrophorese zu erzielen, muß man ein ganz gesundes Material vor uns haben und weiterhin die Stromstärke und Wirkungsdauer minimal halten.

Die benutzte Kataphoresekammer ist 32 mm lang, 2 mm breit und $200\ \mu$ tief (vgl. YAMAHA u. ISHII 1933); Elektrodenabstand beträgt 20 mm, Spannung 50, 100 oder 200 volt und Stromstärke 0,5–10 milliampère. Um die Wirkung der Elektrolysenprodukte, die aus den KCl-Agar-Elektroden durch Agarschicht hindurch in die Beobachtungsflüssigkeit hineindiffundieren können, möglichst zu vermeiden, schalte ich oft ein etwa 1 mm hohes Agarblöckchen (0,02 n KCl in 2 proz. Agaragar) zwischen die Elektroden und Beobachtungsflüssigkeit ein.

Als Versuchsmaterial wurden Pollenmutterzellen von *Tradescantia reflexa*, *Lilium Maximowiczii*, *Lilium auratum* und *Lilium speciosum* angewandt.

Da der Quellungszustand und demgemäß auch die Sichtbarkeit des Karyoplasmas, der das Lichtbrechungsvermögen allein Maß gibt, von der Art und der Konzentration verschiedener Ionen in der Beobachtungsflüssigkeit abhängig zu sein scheinen, (YAMAHA u. ISHII 1932) so wurde zunächst die Bestimmung des pH-Wertes und der elektrischen Leitfähigkeit des Antherenschleimes vorgenommen. Nach der pH-Messung mittels der Indikatorenreihe nach VLÈS sowie der Mikroantimonelektrode, zeigt der Antherenschleim folgende pH-Werte:

Tradescantia reflexa pH 7,0–7,2

Lilium speciosum, *L. auratum*, *L. Maximowiczii* pH 5,3–5,5

Die elektrische Leitfähigkeit des Antherenschleimes entspricht der der KCl-Lösung folgender Konzentration:

Tradescantia reflexa 0,07 n

Lilium auratum 0,01 n

Lilium Maximowiczii, *L. speciosum* 0,02 n

Auf die Sichtbarkeit der karyoplasmatischen Strukturen¹⁾ in der Pollenmutterzelle übt die Konzentration der Anelektrolyte in der Beobachtungsflüssigkeit keinen nennenswerten Einfluß aus, was in folgenden Befunden Bestätigung findet. Bekanntlich kann man in destilliertem Wasser von pH 5,2–5,6 von den karyoplasmatischen Strukturen nichts bemerken. Ebenso wenig sind sie auch in der Rohrzuckerlösung von jeder Konzentration (2 proz. bis auf 100 proz. oder darüber) sichtbar. Das gleiche gilt auch für Glyzerin (2–100 proz.).²⁾ Der Grund dafür scheint darin zu bestehen, daß in die

1) Mit Ausnahme vom Nukleolus.

2) Hier macht Alkohol eine Ausnahme, der das Karyoplasma reversibel zu koagulieren vermag.

Lösung des Anelektrolytes Ionen aus Protoplasma hinausdiffundieren, bis das Karyoplasma in der Pollenmutterzelle infolge der Ionenarmut verquellen geht. Es ist somit nicht einzusehen, daß nach SHIMAKURA (1934) die Chromosomen in der Pollenmutterzelle von *Tradescantia virginiana* in der Rohrzuckerlösung von einer bestimmten Konzentration (ca. 7,4 proz.) sichtbar erhalten bleiben, was jedoch von mir leider nicht bestätigt werden konnte.¹⁾ Um zu sehen, ob es eine bestimmte Konzentration eines Anelektrolytes (Rohrzucker, Glycerin) gibt, wo die karyoplasmatischen Strukturen erst sichtbar werden, verfuhr ich folgendermaßen. Die aus Antheren sorgfältig herausgepressten Pollenmutterzellen wurden in einem hängenden Tropfen von etwa 5 proz. Rohrzuckerlösung aufbewahrt, der auf der Unterseite des Deckglases saß. Das Deckglas mitsamt einem Glasring von etwa 5 mm Höhe und einem gewöhnlichen Objektträger, mit Vaseline verkittet, machte eine luftdicht verschlossene Feuchtkammer aus, auf deren Boden eine genügende Menge von CaCl_2 -Pulver als Entwässerungsmittel geladen ist. Die Rohrzuckerlösung wird allmählich verdichtet, bis sie schließlich eine sirupdichte Konsistenz erhält. Währenddessen wurden die Pollenmutterzellen ununterbrochener Beobachtung unterworfen. Dabei habe ich keinen einzigen Augenblick gefunden, wo man die karyoplasmatischen Strukturen zur Gesicht bekommen kann. In der Rohrzuckerlösung von jeder Konzentration bleiben sie also immer unsichtbar, bis die Zelle schließlich zum Tode vertrocknet ist. Es unterliegt nach alledem keinem Zweifel mehr, daß es zur Sichtbarkeit der karyoplasmatischen Strukturen in der Pollenmutterzelle einer bestimmten Konzentration von Ionen bedarf, was es höchstwahrscheinlich macht, der Quellungsgrad der Karyotinstrukturen ganz und gar durch die freie Ladung derselben bedingt ist (vgl. YAMAHA 1932, YAMAHA und ISHII 1932). Als Beobachtungsflüssigkeit bereitete ich also folgende Lösungen:

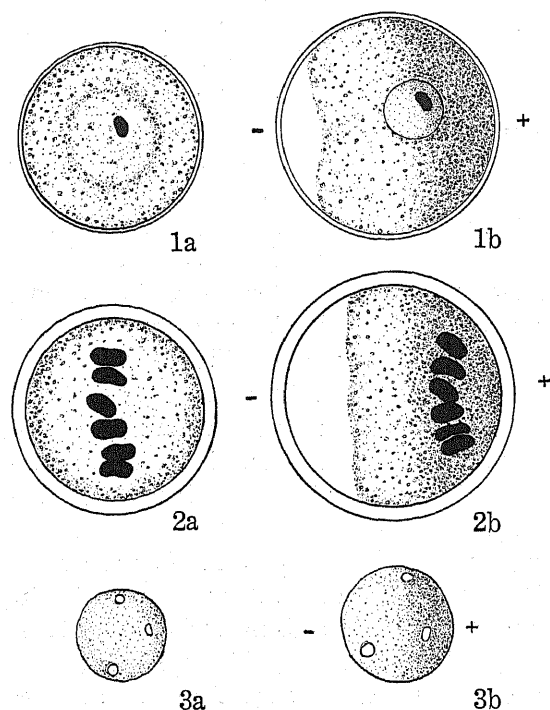
Für *Tradescantia*: 0,1 n KCl (pH 7,0, unter Zusatz von 0,01 n KOH),
0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0),
0,1 n Kaliumazetat (pH 7,2);

Für *Lilium*: 0,02 n KCl (ohne oder mit Zusatz von 10 proz. Rohrzucker),
0,01 n Kaliumazetat + Essigsäure (pH 5,6),
0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,0).

Sowohl beim Herauspräparieren der Pollenmutterzellen aus der Anthere als auch während der Beobachtung derselben müssen die

1) Dabei kamen verschiedene Sorten Rohrzucker zur Anwendung, z.B. „Granutô“, Rohrzucker KAHLBAUM gefällt, KAHLBAUM für kalorimetrische Bestimmungen.

Zellen vor dem leisesten mechanischen Druck (z.B. Messerdruck beim Schneiden, Deckglasbelastung usw.) bewahrt werden; sonst würden



Textfig. 1-3. Schematische Darstellung der Kataphorese an den Pollenmutterzellen und Tapetenzellkernen. 1a, 2a Pollenmutterzelle, 3a Tapetenzellkern vor der Kataphorese; 1b, 2b, 3b dieselben beim Einschalten des Stromes. + Anodenseite. - Kathodenseite.

sie sehr leicht die Plasmoptyse oder noch zutreffender, „Karyoptyse“ erleiden, indem das Zytoplasma samt dem Zellkern durch die Membranpore hindurch in die Beobachtungsflüssigkeit heraustritt. Auffallend ist dabei, daß das Karyoplasma, welches in der Zelle optisch leer erscheint, in der Außenflüssigkeit wie ein zusammengedrücktes Chromosomenklümpchen („tassement“) aussieht (Fig. 1, 2, Tafel 23). Bemerkenswert ist weiter, daß das herausgeflossene Karyoplasma nach Außen hin von einer scharf hervortretenden Niederschlagsmembran umgeben ist.

Nun wende ich mich den Versuchsergebnissen zu. Zunächst möchte ich mich auf die allgemeine Veränderung des Protoplasmas durch elektrischen Strom einlassen, welche allem Anschein nach, wenn auch innerhalb bestimmter Grenzen, unabhängig von der Stromintensität und Wirkungsdauer, immer völlig reversibel verläuft. Man kann nämlich durch die aufeinanderfolgende Ein- und Ausschaltung des Stromes die betreffende Veränderung in einer und derselben Zelle mehreremal wiederholt vor sich gehen lassen. Diese Veränderung des Protoplasten durch elektrischen Strom macht sich bei der Stromstärke zwischen 0,5 und 10 milliampère und bei der Wirkungsdauer von einigen Sekunden bis etwa zu 20 Minuten bemerkbar. Die stärkere Wirkung der Elektrizität ruft natürlich die Koagulation des Zytoplasmas und mitunter die Verquellung des Karyoplasmas hervor. Außer der Elektrizitätsmenge kommt aber

hierbei auch die Ionenkonzentration in der Beobachtungsflüssigkeit zur Geltung. Es scheint dabei gleichsam die minimale Ionenkonzentration für die reversible Koagulation des Karyoplasmas ausschlaggebend zu sein (s. YAMAHA u. ISHII 1932). Denn wir beobachten die in Rede stehende reversible Reaktion des Protoplasten gegenüber der Elektrizität nur bei den gesund aussehenden Pollenmutterzellen, und zwar in 0,1 n KCl-Lösung, aber nicht in 0,2 n (oder darüber) KCl-Lösung. Dabei muß das pH der Lösung, bei *Tradescantia* 7,0, bei *Lilium*-Arten 5,4 sein, d.h. demselben des Antherenschleimes entsprechen. In Anbetracht des allen obigen liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine echt vitale Reaktion des Protoplasmas handle. Es seien nun folgende drei Arten von reversiblen Reaktionen des Protoplasten gegenüber der Elektrizität einer besonderen Bemerkung wert (Textfig. 1–3, Fig. 3–5, Tafel 23):

1. Die sämtlichen Strukturelemente des Protoplasmas (Plasmalemma, Mikrosomen, Karyotingranula, Chromosomen, Spindelsubstanz, Nukleolus usw.), falls Elektrophorese überhaupt einsetzt, verschieben sich immer nach der Anode, was ohne weiteres auf die negative Ladung derselben schließen läßt.

2. Das Zytoplasma erfährt eine merkliche Aufquellung, welche eine Volumvergrößerung der ganzen Zelle nach sich zieht. Die Elektrizität bewirkt also offenbar die Steigerung der Protoplasma-permeabilität.

3. Der Zellkern schrumpft hingegen bedeutend. Dabei tritt die Kernmembran, die in normalem Zustand kaum sichtbar ist, deutlich hervor (Textfig. 1; Fig. 3 a, b, Tafel 23). Wir haben somit hier mit der reversiblen Koagulation des Karyoplasmas durch die Elektrizität zu tun. Bei den Tapetenzellkernen bemerkt man ebenfalls die kataphoretische Wanderung nach der Anode. Auffallend ist aber, daß sich der Tapetenzellkern der Elektrizität gegenüber wie eine ganze Zelle verhält, indem er bei der Stromeinschaltung unverkennbar anschwillt, aber sich nicht zusammenzieht (Textfig. 3).

Wenn man in einer Farbstofflösung (z.B. 0,05 proz. Bromkresolgrün in 0,05 n Azetatpuffer von pH 6,2 bei *Lilium*) Kataphorese ausführt, so beobachtet man zunächst die schwache aber schnelle Anfärbung des Protoplasten in Folge der Permeabilitätssteigerung durch die Elektrizität. Bald darauf folgt aber merkwürdigerweise die allmähliche Entfärbung des Protoplasten, welche augenscheinlich auf dem durch die kataphoretische Wanderung bedingten Hinausdiffundieren des Farbstoffes aus der vital gefärbten Zelle beruht.

Es verdient beiläufig hier zu bemerken, daß der saure Farbstoff bei der Kataphorese in der Zelle, ebenso wie außerhalb derselben, nach der Anode wandert. Dieser Umstand scheint für die elektrische

Theorie der Vitalfärbung von hoher Bedeutung zu sein. Nach KELLER und GICKLHORN (1928) sollen die sauren Farbstoffe, wie sie in wässriger Lösung elektrisch negativ geladen sind, im Protoplasma dagegen positive Ladung tragen sollen, um die elektrisch negativen Strukturen in der Zelle anzufärben. Es soll sich hier also bei der Vitalfärbung des Protoplasmas um eine elektrische Entladung handeln (vgl. auch KELLER 1932, GICKLHORN 1931). Demgegenüber haben meine kataphoretischen Versuche den Beweis dafür erbracht, daß die sauren Farbstoffe auch in der Zelle elektrisch negativ geladen sein können und weiter, daß bei der Vitalfärbung (wenigstens bei der sogenannten diffusen Färbung) mit sauren Farbstoffen keine elektrische Entladung zwischen dem Protoplasma und Farbstoff stattfindet.

Nach bisherigen Literaturangaben fielen früheren Forschern bei der Kataphorese des Protoplasmas bei verschiedenen Objekten bald die positiven, bald die negativen Teilchen, oder aber beiderlei Arten derselben im Protoplasma auf (vgl. SEN 1934). So z.B. fand TAYLOR (1925) in dem Plasmodium von *Stemonitis* neben einer bedeutenden Menge von elektrisch neutralen Körnchen (Mikrosomen) sowohl positiv als auch negativ geladene Teilchen im Protoplasma. SEN (1934) beobachtete dagegen bei der Haarzelle von *Urtica dioica* nur negative Teilchen im Zytoplasma. Nach ihm soll die kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit der protoplasmatischen Teilchen unabhängig von ihrer Größe und Gestalt sein. Bei den Pollenmutterzellen konnte ich niemals positiv geladene Teilchen des Protoplasmas auffindig machen. Dieser Umstand spricht für unsere Schlußfolgerung aus der Bestimmung des pH- und pH_i -Wertes des Protoplasmas in den sich teilenden Pollenmutterzellen. Es wird dabei gezeigt, daß die aktive Reaktion (pH) der sämtlichen Strukturelemente des Protoplasmas in den Pollenmutterzellen durch die ganzen Mitosenstadien hindurch immer auf der alkalischen Seite der isoelektrischen Reaktion derselben bleibt (also $pH > pH_i$), was die negative Ladung derselben andeutet (YAMAHA 1935, 1936). Merkwürdig ist weiter, daß sich das Karyoplasma und das Zytoplasma der Elektrizität gegenüber gleichzeitig einander entgegengesetzt verhalten. Der elektrische Strom wirkt auf das erstere koagulierend bzw. entquellend, demgegenüber auf das letztere aber quellend ein. Ebendasselbe gegensätzliche Verhalten zwischen den beiden Arten der Protoplasmen macht sich auch bei der Wirkung verschiedener Chemikalien geltend (YAMAHA 1927). Dabei erscheint das gequollene (homogenisierte) Zytoplasma nicht selten von dem geschrumpften (entquollenen) Zellkern begleitet. Worauf die betreffende gegensätzliche Reaktion zwischen beiderlei Protoplasmen beruht, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Es ist jedenfalls von Interesse zu

bemerken, daß das Karyoplasma bei der Pollenmutterzelle durch elektrischen Strom, genau so wie bei der Ionenwirkung, reversiblerweise koaguliert wird. Es ließe sich im übrigen dabei eine erhöhte Ionenpermeabilität durch die Elektrizität vermuten. In diesem Zusammenhang wäre es angebracht, die Ladungsverhältnisse beider Protoplasmen quantitativ miteinander zu vergleichen. Es bedarf zur Bestimmung der kataphoretischen Geschwindigkeit jedes von Strukturelementen des Protoplasten in verschiedenen Mitosenstadien Überfülle von völlig gesunden Pollenmutterzellen. Mir stand aber dazu leider keine hinreichende Menge von Material zur Verfügung. So muß man vorderhand nur mit den Resultaten aus vereinzelt Versuchen auskommen.

Die Geschwindigkeit der Kataphorese und deren Rückgangs wurde dadurch berechnet, daß man diejenige Zeitdauer mißt, in welcher ein Strukturelement eine bestimmte Zahl von Teilstrichen des Okularmikrometers durchläuft. Die Zeitmessung wurde durch das Zählen des Ticktacks der Taschenuhr ausgeführt. Es hat sich herausgestellt, daß dieses Verfahren eine viel genauere Messung der Zeitdauer ermöglicht als die Anwendung der Stop-Uhr.

Ein Auszug aus der Versuchsprotokolle wird unten tabellarisch zusammengestellt:

(K...Kataphoretische Geschwindigkeit, R...Rückgangsgeschwindigkeit)

Lilium Maximowiczii

Beobachtungs- medium	Mitosenstadium	Strukturart	Stromstärke milliamp.	K μ	R pro Sekunde
Azetat (pH 5,6)	früh. Pro. I	Mikrosom	0,5	—	0,8
KCl	spät. Pro. I	Plasmahaut	1,5	5,0	0,5
"	" " "	Mikrosom	2,0	—	1,0
"	" " "	Mikrosom*	1,0	4,3	1,5
"	" " "	Kernwand	1,0	2,2	1,3
Azetat+Bromkre- solgrün (pH 6,2)	" " "	Plasmahaut	2,5	7,8	2,2
"	" " "	Mikrosom	2,5	10,0	4,3
KCl	Metaphase I	Mikrosom	0,8	—	2,0
"	" "	Plasmahaut	0,8	—	0,5
"	" "	Chromosom	0,8	—	0,8
Phosphat (pH 6,0)	" "	Chromosom	3,0	0,9	0,6
"	Anaphase I	Mikrosom*	2,5	13,0	2,6
"	" "	Mikrosom	2,5	—	2,2
KCl	" "	Mikrosom	0,7-1,0	—	1,8
"	" "	Plasmahaut	0,7	—	0,5
"	" "	Chromosom	0,7-0,8	2,2	0,4-0,7
"	Telophase I	Plasmahaut	8,5	3,5	2,0
KCl	Prophase II	Plasmahaut	5,0	1,5	1,0
"	" "	Mikrosom	1,2	1,9	1,3
Azetat (pH 5,6)	" "	Mikrosom	1,2	1,9	2,0

Beobachtungs- medium	Mitosenstadium	Strukturart	Stromstärke milliamp.	K μ	R pro Sekunde
Azetat (pH 5,6)	Prophase II	Plasmahaut	1,2	—	1,0
Phosphat (pH 6,0)	Metaphase II	Plasmahaut	3,0	1,6	0,8
Azetat (pH 5,6)	„ „	Mikrosom	2,0	13,0	1,2
„	Anaphase II	Mikrosom	1,2	4,0	0,9
KCl	Telophase II	Mikrosom	5,0	2,6	1,0

Lilium speciosum

Bromkresolgrün (pH 5,5)	früh. Prophase I	Mikrosom	1,5-2,0	7,8	4,9
Phosphat (pH 6,0)	„ „ „	Mikrosom	2,5-3,0	7,8	1,3
KCl	„ „ „	Mikrosom	2,5-3,0	—	1,3
„	Metaphase I	Mikrosom	0,9	2,6	1,8
„	Telophase I	Mikrosom	1,3	1,3	1,1
„	„ „	Plasmahaut	1,3	1,0	0,9
„	Metaphase II	Chromosom	7,5	1,6	1,0
„	Telophase II	Mikrosom	5,0	1,9	1,0
„	Tetrade	Mikrosom	0,9	4,0	2,6
„	„	Mikrosom*	0,9	4,0	1,3

(*...in der peripheren Schicht des Zytoplasmas)

Die Versuchsergebnisse sind allerdings zu lückenhaft, um über die Ladungsverhältnisse und die Viskosität des Protoplasmas der sich teilenden Pollenmutterzellen allgemeine Schlüsse ziehen zu lassen. Jedenfalls kann man aus der Tabelle entnehmen, daß die kataphoretische Geschwindigkeit jenach dem Strukturelement und dem Mitosenstadium sowie dem Beobachtungsmedium verschieden ausfällt. Es ist zunächst hervorzuheben, daß zwischen der kataphoretischen Geschwindigkeit und der Rückgangsgeschwindigkeit keine enge zahlenmäßige Beziehung zu erwarten ist, obwohl die beiden Werte durch die Protoplasmaviskosität entscheidend beeinflusst werden können. Kataphoretische Geschwindigkeit (W) läßt sich in folgender Formel ausdrücken:

$$W = \frac{\zeta HD}{4\pi\eta}$$

worin ζ die Potentialdifferenz an der Oberfläche der dispersen Phase (Strukturelement) des Protoplasmas (sog. elektrokinetisches Potential), H die Feldstärke (Stromstärke), D die Dielektrizitätskonstante, η die Viskosität des Protoplasmas bedeutet. Kataphoretische Geschwindigkeit verhält sich somit umgekehrt zur Protoplasmaviskosität. Außerdem verändert sie sich zu der Feldstärke und dem elektrokinetischen Potential direkt proportional. Dieser Wert kann also die Ladungsverhältnisse der Strukturelemente nur bei konstanter Protoplasmaviskosität kundgeben. Im übrigen gilt diese Größe dann keineswegs als Maß der Protoplasmaviskosität, wenn die Veränderung der Ladungsverhältnisse möglich erscheint, wie es eben hier in der sich teilenden Zelle der Fall ist. Demgegenüber läßt sich die Rück-

gangsgeschwindigkeit anscheinend als Maß der Protoplasmaviskosität und auch der angeblichen Elastizität des Protoplasmas, ins besondere der Plasmahaut (höchstwahrscheinlich auch der Kernmembran) auffassen. Diese Größe erwies sich, innerhalb bestimmter Grenzen, in höherem Masse unabhängig von der Feldstärke (Stromintensität). Verminderte Rückgangsgeschwindigkeit sowie der kataphoretischen Geschwindigkeit beim wiederholten Ein- und Ausschalten des Stromes deutet aber ohne Zweifel auf die eintretende irreversible Koagulation des Protoplasmas durch elektrischen Strom hin.

Beim Überblick der obenstehenden Tabelle fällt u. a. ohne weiteres in die Augen, wie bedeutend die beiden Werte durch das Beobachtungsmedium beeinflusst werden und weiter, wie sie auch in einer und derselben Zelle von einem Strukturelement zu einem anderen schwanken. So bemerkt man beim Vergleich der R-Werte untereinander, daß das Azetat im Vergleich zum KCl auf Protoplasma deutlich verflüssigend einwirkt. Die Erniedrigung der Protoplasmaviskosität erscheint besonders auffällig bei der Bromkresolgrünlösung, welche überdies durch ihre negative Ladung die Negativität des Protoplasmas verstärkt, wie man aus einem größeren K-Wert ersehen kann. Die Viskosität des Zytoplasmas, die in der Zellperipherie und in der Nähe des Zellkernes stets voneinander verschieden erscheint, schwankt in verschiedenen Mitosenstadien innerhalb weiten Grenzen. Sie erniedrigt sich unverkennbar in der Metaphase und erhöht sich merklich in der Telophase (vgl. YAMAHA 1935, YAMAHA u. YUNOKI 1936). Der Plasmahaut und der Spindelsubstanz kommt die höchste Viskosität zu.

Was die Ladungsverhältnisse des Protoplasmas in verschiedenen Mitosenstadien betrifft, so ergibt die Tabelle darüber leider nichts eindeutiges. Nur findet man in vereinzelt Fällen einen verhältnismäßig hohen K-Wert für die Mikrosomen in der Metaphase, wofür man vorläufig die erniedrigte Viskosität des Zytoplasmas verantwortlich machen dürfte. Wir möchten somit die Erörterung dieser Frage weiterer Mitteilung vorbehalten.

Zusammenfassung

1. Für die Sichtbarkeit, also den Quellungszustand der karyoplasmatischen Strukturen (den Nukleolus ausgenommen) in der Pollenmutterzelle erscheint die Ionenkonzentration, aber nicht der osmotische Wert der Beobachtungsflüssigkeit ausschlaggebend.
2. Die Pollenmutterzellen fallen leicht durch leisen mechanischen Eingriff der „Karyoptyse“ anheim.
3. Der elektrische Strom wirkt auf das Zytoplasma quellend, dagegen auf das Karyoplasma aber entquellend ein. Außerdem ver-

ursacht die Elektrizität die reversible Koagulation des letzteren.

4. Die sämtlichen Strukturelemente des Protoplasmas in den sich teilenden Pollenmutterzellen wandern in lebendem Zustand in elektrischem Felde immer nach der Anode, was die negative Ladung derselben andeutet. Diese Elektronegativität des Protoplasmas wird durch die diffuse Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen nicht im geringsten vermindert, sondern im Gegenteil merklich vergrößert.

5. Die Messung der Rückgangsgeschwindigkeit der Kataphorese hat sich als eine Schätzungsmethode der Protoplasmaviskosität brauchbar erwiesen.

6. Die kataphoretische Geschwindigkeit, wie auch die Rückgangsgeschwindigkeit, verschiedener Strukturelemente in der Pollenmutterzelle schwankt im Laufe der Karyokinese in weitem Maße. Die Beobachtungsflüssigkeit hat darauf einen nicht unbedeutenden Einfluß.

Zum Schluß spricht der Verfasser auch an dieser Stelle der „Gakuzyutu-Sinkôkwai“-Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung bei der Durchführung vorliegender Untersuchungen seinen herzlichsten Dank aus.

Literaturverzeichnis

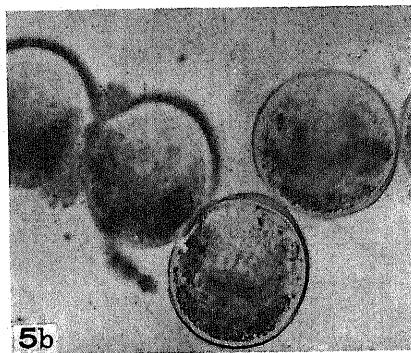
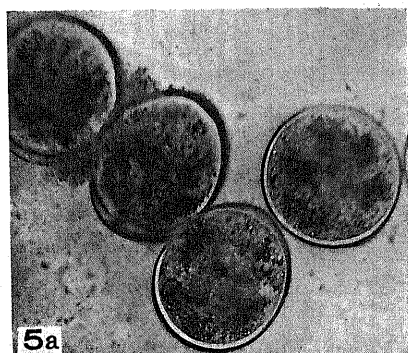
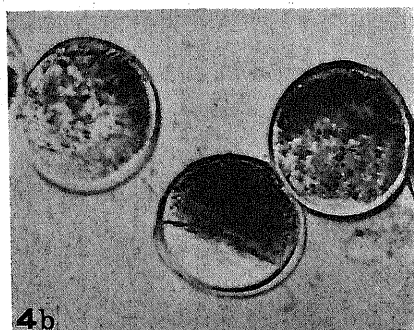
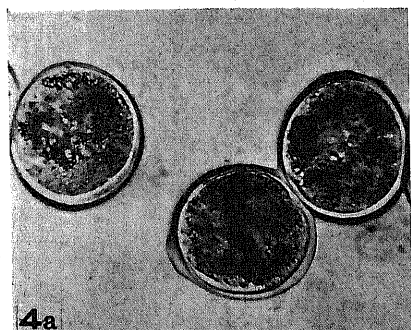
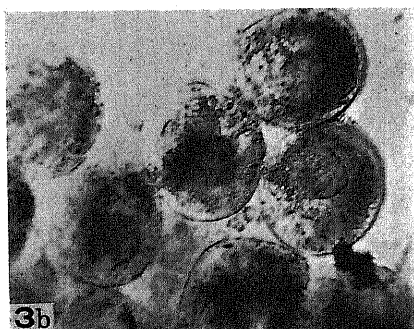
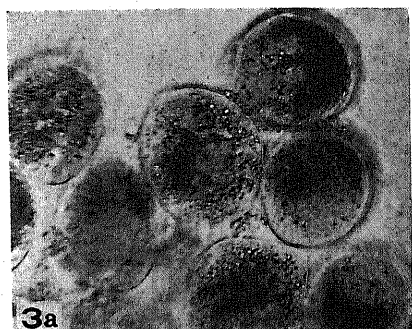
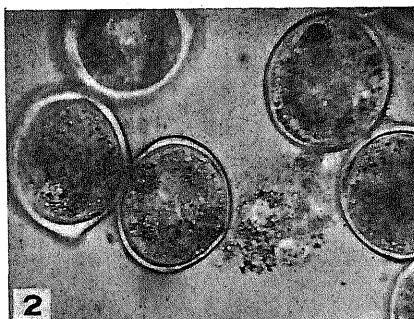
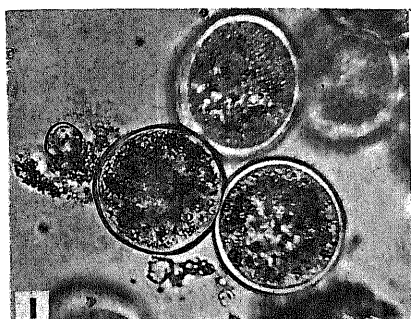
- Bersa, E. (1925) Pflügers Arch. 210: 392-405.
 — u. Weber, F. (1922) Ber. d. D. Bot. Ges. 40: 254-258.
 Gicklhorn, J. (1931) Ergebn. d. Biol. 7: 549-685.
 Höber, R. (1933) Protoplasma 19: 26-29.
 Keller, R. (1932) Die Elektrizität in der Zelle. 3. Aufl. Mährisch-Ostrau.
 — u. Gicklhorn, J. (1928) ABDERHALDENS Handb. d. biol. Arbeitsm. Abt. V, Teil 2, S. 1189-1280.
 Sen, B. (1931) Ann. of Bot. 45: 527-531.
 — (1934) Ebenda 48: 143-151.
 Shimakura, K. (1934) Cytologia 5: 363-372.
 Taylor, C. V. (1925) Proc. Soc. exp. Biol. Med. 22: 533-536.
 Umrath, K. (1930) Protoplasma 9: 576-597.
 Yamaha, G. (1927) Journ. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, III 2: 215-296.
 — (1932) Proc. Imp. Acad. Tokyo 8: 315-317.
 — (1935) Cytologia 6: 523-526.
 — (1936) Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, B. 2: 209-221.
 — u. Ishii, T. (1932) Cytologia 3: 333-336.
 — u. — (1933) Protoplasma 19: 194-212.
 — u. Abe, S. (1934) Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, B. 1: 221-229.
 — u. Yunoki, T. (1936) Bot. Mag. (Tokyo) 50: 99-104.

Erklärung der Tafel 23

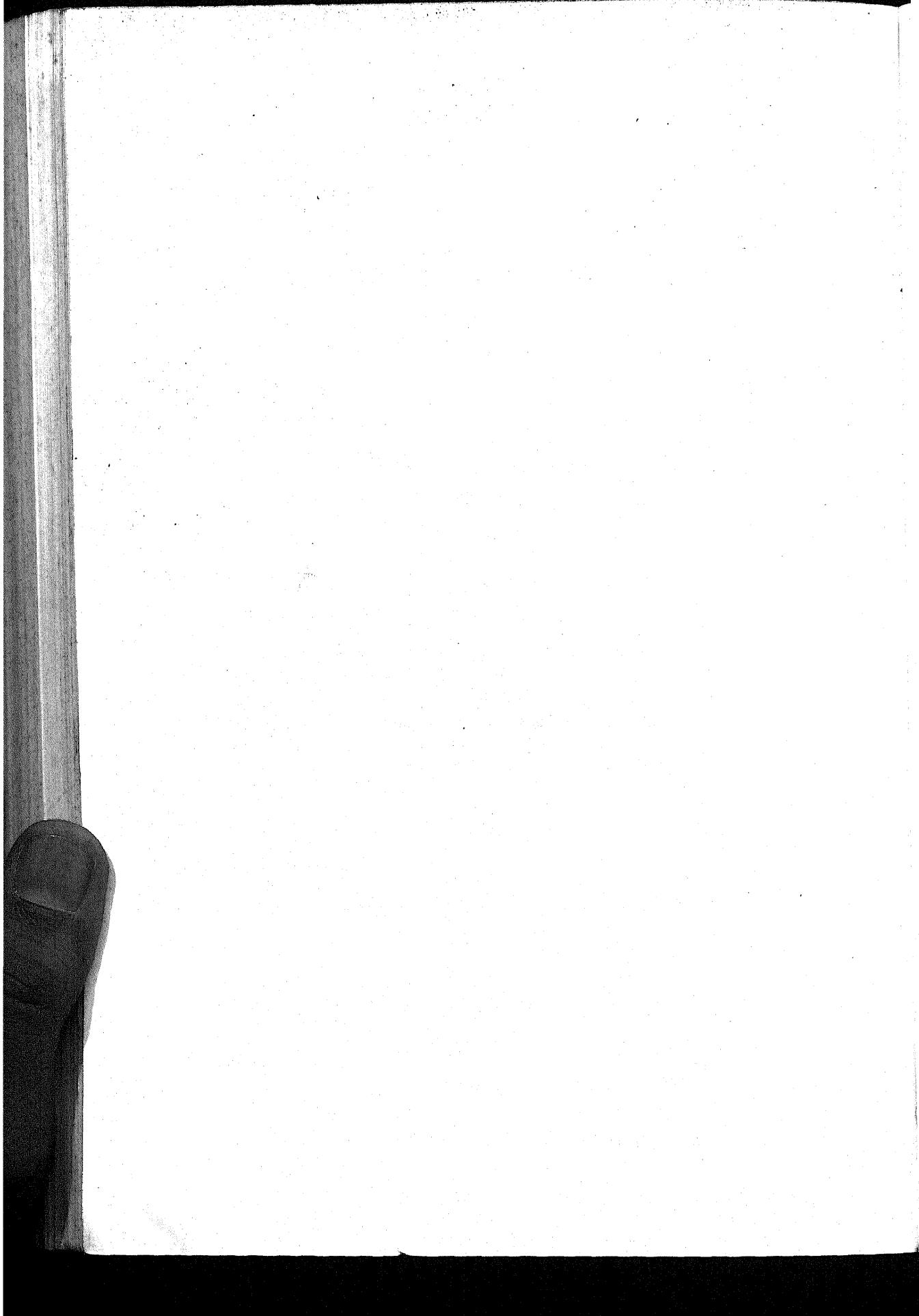
Mikrophotographien, die sich auf die Pollenmutterzellen von *Lilium Maximowiczii* beziehen, wurden mit Hilfe von LEITZ-Makam aufgenommen: Vergrößerung ca. 240 mal.

Fig. 1, 2. „Karyoptyse“ durch mechanischen Eingriff.

Fig. 3a, 4a, 5a. vor der Kataphorese; 3b, 4b, 5b. beim Einschalten des elektrischen Stroms schwillt die Zelle an, ist der Kern sichtbar und geschrumpft; die sämtlichen Strukturelemente wandern nach der Anode.



Y a m a h a: Kataphoretische Versuche an den Pollenmutterzellen
einiger Pflanzen



**Some Observations upon the Mitotic and Meiotic Divisions in the
Wistar Rat**

**IV. Effect of factors influencing the functional development
of the male gonad**

By

William Bryden

University of Melbourne, Melbourne, Australia

Introduction

Development of the gonads as a function of anterior pituitary lobe has been studied by various workers. It is considered that any effect upon the testicle may be exerted on two morphologically and physiologically different parts, one of these being the tissue upon which the elaboration of spermatozoa is dependent. The results obtained have led to many other investigations on the effect on the testicle by the agency of various extracts and substances. In this study animals were treated with (1) Pituitary implants, (2) pituitary extracts, (3) gonadotropic extract from pregnancy urine and (4) lipoid extract (heart muscle). In each case litter mates were used as controls.

I am indebted to Drs. J. M. Robson and H. Taylor of the Institute of Animal Genetics, Edinburgh for providing me with testes of treated and control animals. They carried out the experiments and the general methods, weights etc., here recorded were kindly supplied by them. I have further to thank Professor F. A. E. Crew, the Director of the Institute, for helpful suggestions throughout the course of the study.

Previous Work

Smith and Engle (1927) studied the effect of implantation of anterior pituitary lobe (rat) and concluded that though there was no increase in body weight there was an increase in testicle weight.

Biedl (1927) found that testicle growth in rats and mice was retarded by implantation of anterior lobe.

An increase in the frequency of the mitotic divisions after implantations of anterior pituitary lobe was suggested by Borst, Doderlein and Gostimirovic (1930). Biedl (1927) agreed with the results of Evans and Simpson (1927) that testicle growth was retarded by alkaline extract of pituitary lobe.

Boeters (1931), Bounty (1931) and de Jongh (1931) studied the effect of gonadotropic extract from pregnancy urine and concluded that in rats and mice there was no effect on testicular growth or spermatogenesis.

Moore and Price (1932) record an interference with the germinal epithelium of the testicle after treatment with heart muscle.

In a previous paper (1932) the author has described the somatic chromosome complex of the Wistar rat as well as the meiotic stages the latter of which have been analysed on the partial chiasmatype hypothesis of Janssens (1909, 1924) and elaborated by Darlington (1932). Further studies have been made (1935 a, b, c) on environmental changes affecting the cell divisions.

In this study it is proposed to examine the effects on the cell divisions, and further, to include calculations made on the frequency of chiasma formation.

Materials and Methods

White rats originally belonging to the Wistar stock have been used throughout. All the animals were kept on the usual stock diet and precautions were taken to eliminate the effects of crowding. The animals were about six weeks old at the conclusion of each test. The following substances and extracts were used (details from Robson and Taylor):

(1) *Bovine anterior pituitary lobes*. These were obtained from a slaughter house and kept in a frozen condition until needed. The tissue was minced up immediately before injection by forcing through a fine sieve.

(2) *Ammonia extract of bovine pituitary lobe*. Ten grams of minced anterior lobe were stirred for three hours with 30 c.c. 20½ ammonia (S.G. 0.95). Most of the ammonia was then removed by passing through a current of air and the whole then neutralised with glacial acetic acid. The solid substance was removed by centrifuging and an antiseptic, quinamil, added to the supernatant fluid in a concentration of 0.25%.

(3) *Oestrin free gonadotropic preparation from the urine of Pregnant women*. Prepared by the method of Wiesner and Marshall (1932). The extract contained approximately five luteinising mouse units per milligram.

(4) *Rabbits' Heart Muscle*. The heart was removed immediately after the death of the animal and minced up in the same way as the anterior lobe tissue. In order to prevent sepsis an antiseptic (quinamil) was added to the heart and anterior lobe tissue.

The testes were removed from the animals, weighed, and then fixed immediately in 2BD and 2BE (La Cour 1931). The sections were cut at 12 μ –14 μ and stained with the standard gentian violet stain. The drawings were made with a Zeiss camera lucida and an H.I. 90, 1.30 apochromate oil-immersion objective at 3500 diameters and reduced.

Results

(1) *Anterior pituitary lobe.* The rats received 0.05 c.c. of anterior pituitary substance every second day, together with a similar volume of 0.1% solution of quinamil in Ringer Locke.

(2) Other animals were treated with an alkaline extract of pituitary lobe receiving 0.2 c.c. of the extract every second day for the first week and 0.4 c.c. subsequently.

The sectioned testes from these two classes showed few general differences the one from the other. Mitotic divisions were abundant and appeared similar to those described by the author in a previous publication (1932).

All stages of meiosis were very evident being similar to those described previously. In the early diplotene stages the bivalents were very evident, exhibiting decided looping and chiasma formation. In late prophase the chromosomes, much contracted and thicker, showed more decided evidence of presence of chiasmata and it was noticed that the association of the previously free ends of bivalents occurred in many instances—the “terminalisation” of chiasmata probably previously interstitial (Darlington 1931). In metaphase, the bivalents were not spread out and scattered in a manner similar to some forms exhibited in the environmental studies (1935a). Stages exhibiting anaphase and telophase and instances of the second spermatocyte division have been observed and are similar to those described previously.

The sections prepared from the testes of litter mate controls exhibited stages similar to those described. The number of metaphase plates observed appeared greater in the control sections but there were no decided differences in the general appearance of any of the meiotic stages observed in the treated and untreated animals. A count has been made of the relative percentages of the meiotic stages observed together with the frequency of tubules in which no divisions were evident—the count was made over 750 tubules, the sections being taken at random from all the slides prepared. See Table 1.

Table 1. The frequencies of stages of prophase and metaphase along with the number of barren tubules observed

Treatment	Prophase	Metaphase	Barren
Implant	59.1	3.2	37.7
Extract	62.0	3.9	34.1
Control	84.2	5.4	10.4

The average testicle weight of implant treated animals is 0.462 gm. the extracts 0.512 gm. and the controls 0.667 gm. “It is worth pointing out that quite apart from any effects of the injections, there

exists a distinct correlation between size of testicles and degree of spermatogenesis." From the figures given in Table 1 this fact appears to be borne out. The general effect of anterior pituitary lobe appears to be manifest in the decreased size of the testes which is accompanied by decreased spermatogenetic activity. The implants appear to be more severe in effect than the extracts.

(3) *Gonadotropic extract from the urine of pregnant women.* The animals used in this experiment received 50 mouse units of the extract (in Ringer Locke) every day for 15 days. This substance produced a marked effect on the size of the testicle, the average weights from treated animals being 0.887 gm. compared with 0.408 gm. in the litter mate controls.

The cytological examination revealed that though the size has been increased, there is no marked increase in the amount of spermatogenesis going on. The number of barren tubules is not as great as in the previous treatment but there is no great increase in the number of metaphase stages observed. The results of the stage counts are shown in Table 2.

Table 2. Counts from animals treated with gonadotropic extract compared with the litter mate controls—in percentages

Treatment	Prophase	Metaphase	Barren
Gonadotropic Extract	69.1	4.7	26.2
Litter mate control	83.3	5.3	11.4

The results listed in Table 2 indicate that there is no increase in spermatogenesis through the treatment though there is a decided increase in testicle weight. In fact from the figures given it would appear that there is some degree of inhibition with the treatment, though this is manifest mainly in the percentage of barren tubules exhibited—the metaphase numbers bear a very favourable relation the one to the other.

(4) *Heart Muscle.* Animals were injected every second day with 0.025 gm. of heart muscle and a similar amount of 0.1% solution of quinamil, for one week and with twice these amounts of heart muscle and quinamil solution for a further twenty-six days. The animals were between seven and eight weeks of age at the conclusion of the treatment. There was an inhibition of the growth of the testicle; the average weight of the treated individuals was 0.35 gm. whereas the litter mate controls averaged 0.566 gm. As in the anterior pituitary lobe treatments spermatogenesis appeared checked but not to such an extent. A count on lines similar to those made in the other treatments has been made for the heart muscle treatments and the results are given in Table 3.

Table 3. The percentage of prophase, metaphase and barren tubules observed in sections from heart muscle treatments and the litter mate controls

Treatment	Prophase	Metaphase	Barren
Heart Muscle	82.9	4.9	12.2
Control	81.2	8.8	10.0

Though there is a decided difference between the average testicle weights of the treated and the control animals the activity of spermatogenesis appears to be but little affected.

A further observation has been made over all the treatments and the litter mate controls regarding the percentage of stages present in those tubules exhibiting division of the first and/or second spermatocyte. The calculations have been made by taking sections at random—twelve sections were taken over all the slides prepared, one section being known to contain metaphase configurations in each case. The results are shown in Table 4.

Table 4. The percentages of prophase and metaphase from those tubules exhibiting spermatocyte divisions

Treatment	Prophase	Metaphase	Testicle Weights
Pituitary Implant	88.8	11.2	0.462 gm.
„ Extract	87.0	13.0	0.512 gm.
Litter mate control	80.2	19.8	0.667 gm.
Gonadotropic Extract	84.9	15.1	0.887 gm.
Litter mate control	81.4	18.6	0.408 gm.
Heart muscle	87.0	13.0	0.35 gm.
Litter mate control	85.7	14.3	0.566 gm.

This table shows that the actual divisions, apart from the tubules showing the evidence of any stages, are closely related. The controls in every case exhibit a higher percentage than do the treatments but there appears no great difference between the treatments. The pituitary implant shows the smallest percentage of metaphase (and later than metaphase) stages, the pituitary extract value being somewhat similar to the values obtained for the heart muscle. The gonadotropic extract differs but little from the controls—the frequency of metaphase stages is greater than the average of one control but less than the average in the litter mates of the other two treatments.

Chiasma Formation

Bivalent types are similar to those described earlier (1932) and the irregular behaviour of the sex chromosomes sometimes observed has been seen in several instances in all treatments. Counts were made of the frequency of chiasma formation both in diplotene and metaphase stages, the results being listed in Table 5.

These results indicate that the frequencies of chiasma formation are but little affected in both the early and in the metaphase stages of the various treatments.

Table 5. The frequency of chiasma formation in early diplotene and metaphase stages for all the treatments and the litter mate controls

Treatment.	Bivalent Number.	Early Diplotene				Chias. Freq.	Metaphase			Chias. Freq.
		1×ta	2×ta	3×ta	4×ta		1×ta	2×ta	3×ta	
Pituitary Implant.	300	88	125	75	12	2.04	149	129	22	1.57
„ Extract.	300	91	128	56	25	2.05	147	139	14	1.556
Litter Mate Control.	300	97	129	55	19	1.99	136	146	18	1.609
Gonadotropic										
„ Extract.	300	98	118	71	13	1.99	162	109	29	1.56
Litter Mate Control.	300	79	134	68	19	2.09	155	126	19	1.54
Heart Muscle.	300	87	129	55	29	2.09	157	122	21	1.55
Litter Mate Control.	300	100	107	71	22	2.05	133	155	12	1.60

Taylor and Robson found that the treatments exerted a definite effect upon the testicle. In most cases it became smaller in size than the corresponding litter mate control but in the gonadotropic treatment the size became greatly increased. With reduction in size it was found that spermatogenesis was checked, the tables of frequencies of stages giving some indication of the amount of actual meiotic division going on.

Though spermatogenesis has been checked by the treatment, the frequencies with which the chiasmata are formed in the various stages is not markedly different in the treated animals. All animals exhibited similar types of bivalents, regular and usual arrangement in the various stages. These results are in contrast to those of the extremes of temperature, above and below the optimum, where decided effects on the bivalents in division were found. In the observation carried out in this work, little difference from the normal could be observed in the actual divisions. But other results—from the cytological examination—parallel the recorded results of Robson and Taylor.

Literature

Apart from the references given by Robson and Taylor, the following have been cited:—

- Bryden, Wm. (1932) "Cytogenetic studies on the rat. Somatic chromosome complex, meiosis, and chiasma frequency." *Journ. of Genetics* 26.
- (1935-36 a, b, c) "Some observations upon the mitotic and meiotic divisions in the Wistar Rat." I, II, III. *Cytologia* 6 and 7.
- Darlington, C. D. (1931) "Meiosis." *Biol. Rev.* 6.
- (1932) "*Recent advances in Cytology*." London.
- Janssens, F. A. (1909) "Spermatogénèse dans les Batraciens. V. La Théorie de la chiasmotypie: nouvelle interpretation des cineses de maturation." *Cellule* 25.
- (1924) "La chiasmotypie dans les insectes." *Ibid* 34.
- La Cour, L. (1931) "Improvements in everyday technique in plant cytology." *Jour. Roy. Mic. Soc.* 51.
- Robson, J. M. and Taylor, H. (1933) "Factors influencing the functional development of the male gonad." *Proc. R. Soc. B.*

**D'un hybride d'espèces de *Narcissus* et de sa mutation somatique
à la duplication du nombre des chromosomes et des nucléoles**

par

Willem Eduard de Mol, Amsterdam

(Publication de la Société néerlandaise pour stimuler l'amélioration
scientifique des plantes ornementales)

En l'honneur du soixante-dixième anniversaire de Monsieur le professeur Dr. K. Fujii ci-joint sont publiés quelques faits concernant l'hybride d'espèces de *Narcissus pseudonarcissus* et *N. poeticus*, dont l'auteur a vu naître pour la première fois une mutation somatique notablement plus grande et avec une construction différente de noyau. Ce cas de mutation somatique a été cité déjà autrefois, cf. 1925 a, b; 1926 a; 1928 b; 1932 b. L'hybride d'espèces en question (fig. 1) — l'auteur ne se rapelle plus laquelle des deux espèces indiquées soit ♀ ou ♂ — et sa mutation (fig. 2) sont cultivés pendant de longues années à l'entreprise d'amélioration à Lisse, de la S. A. Frères Nieuwenhuis et de l'auteur.

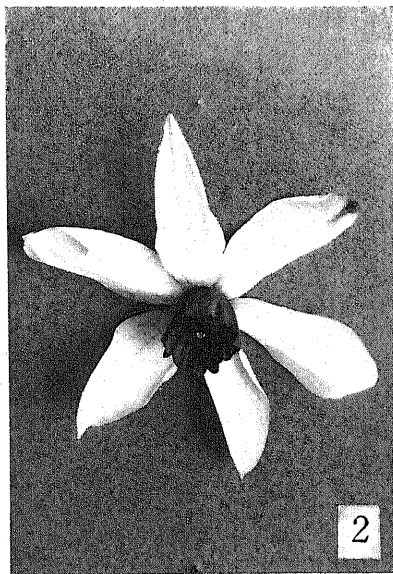
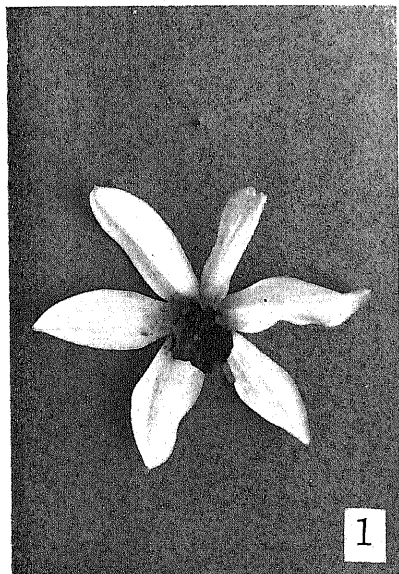


Fig. 1. Hybride d'espèces diploïde de *Narcissus pseudonarcissus* et de *N. poeticus*.
Fig. 2. Mutation somatique tétraploïde de l'hybride d'espèces diploïde.

Une différence sensible se montre surtout entre la dimension des fleurs et celle des feuilles. Pour en voir toute l'importance il faut

comparer des individus arrivés au terme de leur croissance. Cela est expliqué par la fig. 3. Cette photo, d'une plante en pleine terre,



Fig. 3. Mutation somatique tétraploïde; une bulbe arrivée au terme de sa croissance avec une jeune bulbe, toutes les deux produisent une fleur, mais de dimensions différentes.

dans le jardin d'expériences, le 5 mai 1922, nous montre quelque chose de la multiplication végétative de la mutation somatique. Une bulbe arrivée au terme de sa croissance et une jeune bulbe pas encore séparée de la première ont produit toutes les deux une fleur. Les dimensions des fleurs diffèrent autant que celles de la mutation complète et de l'hybride original arrivé à terme.

Cette mutation somatique s'est maintenue végétativement pendant de longues années déjà et un clone de milliers de plantes en a été cultivé.

Les cultivateurs de Narcisses rangent l'hybride d'espèces et sa mutation au nombre des formes de la "Division"

des "Incomparabilis", cf. Classified List of Daffodil names, Royal Horticultural Society, 1927: "cup or crown not less than one-third but less than equal to the length of the perianth segments".

La mutation est la reproduction exacte mais plus grande que l'hybride original. Même ses caractères physiologiques, comme le commencement de la floraison, la durée de la floraison, l'époque où la fleur se flétrit, le plus ou moins de résistance contre différentes maladies, n'ont pas changés.

Il y a bien longtemps que la recherche cytologique des cellules somatiques a eu lieu. L'année passée on a refait ces recherches avec

des matériaux nouveaux. L'auteur est bien reconnaissant envers Monsieur le Professeur Dr. B. C. P. Jansen, directeur du laboratoire pour la chimie physiologique de l'université d'Amsterdam, pour son hospitalité qui lui a permis de faire des travaux cytologiques plus poussés. Sa reconnaissance va encore à Madame F. Prins-Sandvoort en premier lieu et aussi à Mesdemoiselles W. A. G. H. Westendorff et D. M. Meekhof pour l'assistance très appréciée qu'elles ont bien voulu prêter à ces recherches.

Le 9 octobre 1935 les racines des bulbes plantées dans des pots avaient assez poussé pour que les extrémités puissent être fixées. Ceci a été fait dans „Nawaschin“. Les préparations les plus meilleures ont été obtenues après avoir mis les objets régulièrement dans des alcools d'un pourcentage de plus en plus fort; le 11 octobre dans 2½%, 5%, 7½%, 10%, 30%; le 12 octobre dans 40%, 50%, 70%, 85%, 96%; le 13 octobre deux fois dans 100%. La coloration a eu lieu dans l'hématoxiline d'après Heidenhain. On a contrôlé exactement combien de temps les préparations devaient rester dans l'alun ferrique (solution de 3%) afin que la construction du noyau puisse être observée de la manière la plus claire; ceci devait être 45 minutes.

Après une immersion de 10 minutes dans l'alun ferrique la construction du noyau était peu claire; après 30 minutes plus claire; après 90 minutes aussi claire qu'après 45 minutes.

Le nombre chromosomique de l'hybride d'espèces monte à 14 (fig. 4), celui de la mutation somatique à 28 (fig. 5). Par conséquent une duplication du nombre chromosomique a eu lieu. Quand le nombre chromosomique monoploïde de *N. pseudonarcissus* est représenté par x et celui de *N. poeticus* par x' on peut dire que l'hybride d'espèces diploïde est caractérisé par $x + x' = 14$ et sa mutation somatique tétraploïde ou di-diploïde par $2(x + x') = 28$.

Aux plaques équatoriales diploïdes on peut très bien voir que les chromosomes se trouvent deux par deux. Comment est-il fait maintenant de l'ordre des chromosomes dans les plaques équatoriales tétraploïdes? Pour le moment l'auteur en vient à la conclusion qu'on doit être prudent avec l'acceptation d'une couche des chromosomes deux par deux, comme c'est indiqué ci-dessus, et qu'on doit être excessivement prudent de dire qu'ils se trouvent quatre à quatre.

L'auteur reconnaît par avance que sa réponse est plutôt une hypothèse qu'une preuve. En tout cas c'est une hypothèse qui n'est pas née sans l'avoir essayée.

Dans les deux cas une métaphase dans une des plus grandes cellules du périlème a été prise comme exemple. Les coupes et les cellules ont été choisies de sorte qu'une comparaison de dimension

était permise. La différence entre les dimensions des cellules et celles des noyaux est donc claire.

Cette différence se manifeste aussi aux extrémités des racines et aux racines entières pourvu qu'on choisisse les matériaux à comparer d'une manière juste.

Le plus grand nombre de nucléoles qu'on a observé à l'hybride monte à 2, à la mutation il monte à 4. La différence de dimension des cellules et des noyaux se reflète nettement de la même manière dans les tableaux des cellules, noyaux et nucléoles. Fig. 6 représente un noyau de l'hybride, avec un seul nucléole. Fig. 7 nous montre un noyau avec deux nucléoles. Les fig. 8 et 9 se rapportent à la mutation. On voit ici la représentation d'un seul nucléole et de quatre nucléoles.

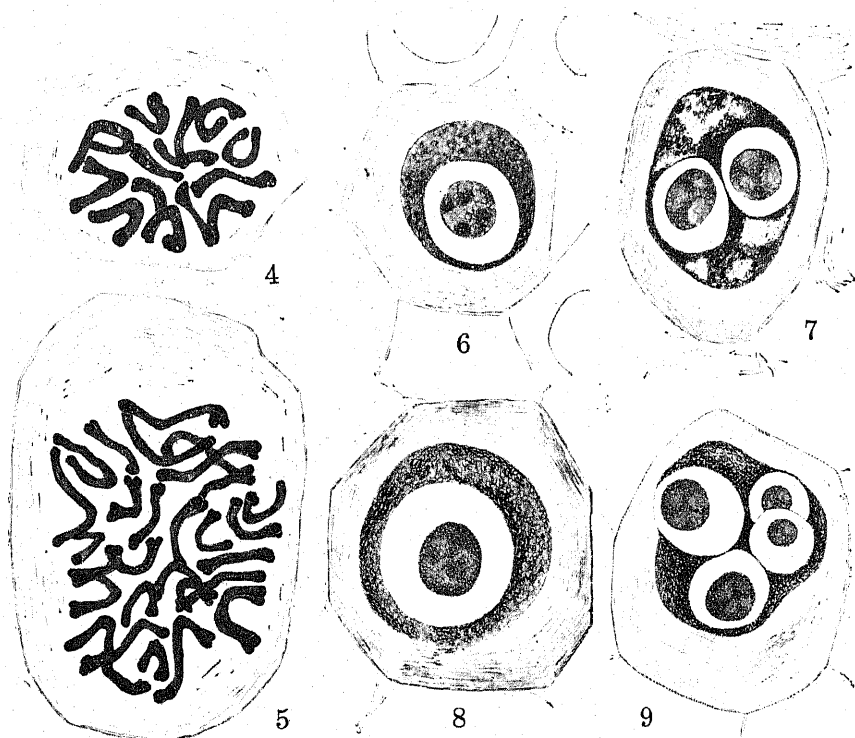


Fig. 4. Plaque équatoriale, cellule de périlème, coupe transversale de racine de l'hybride d'espèces; 14 chromosomes. Agrandissement ± 1500 fois. Fig. 5. Plaque équatoriale, cellule de périlème, coupe transversale de racine de la mutation somatique; 28 chromosomes. Agrand. ± 1500 fois. Fig. 6. Noyau dans une cellule de périlème, coupe transversale de racine de l'hybride d'espèces; noyau avec un seul nucléolus. Agrand. ± 1500 fois. Fig. 7. Noyau dans une cellule de périlème, coupe transversale de racine de l'hybride d'espèces; noyau avec deux nucléoli. Agrand. ± 1500 fois. Fig. 8. Noyau d'une cellule de périlème, coupe transversale de racine de la mutation somatique; noyau avec un seul nucléolus. Agrand. ± 1500 fois. Fig. 9. Noyau d'une cellule de périlème, coupe transversale de racine de la mutation somatique; noyau avec 4 nucléoli. Agrand. ± 1500 fois.

Tout se rapporte aux cellules comparables du périblème. Plusieurs mesurages montrent que la mutation possède un volume presque deux fois plus grand de matière nucléolaire que l'hybride ordinaire. On a pris une épaisseur de coupes de 15μ .

Une recherche détaillée de nucléoles et de chromosomes a lieu à l'heure actuelle. En outre la meiose des deux formes sera étudiée. Et en suite on doit examiner si une différence de dimension ou de nombre existe entre les grains de chlorophylle et entre les chromatophores jaunes et les plastides qui se trouvent au bord de la paracorolla apportant sous forme de cristaux de carotène, la couleur orange.

Dans l'hybride d'espèces et dans sa mutation la stérilité du pollen est assez grande. Pour les deux formes la différence n'est pas importante de sorte qu'on peut accepter que la stérilité des microgamètes est surtout

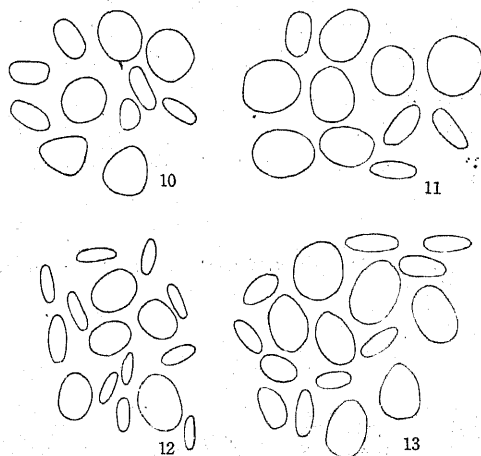


Fig. 10. Graines de l'hybride d'espèces, commencement de la floraison. Agrand. ± 140 fois. Fig. 11. Graines de la mutation somatique, commencement de la floraison. Agrand. ± 140 fois. Fig. 12. Graines de l'hybride d'espèces, la fin de la floraison. Agrand. ± 140 fois. Fig. 13. Graines de la mutation somatique, la fin de la floraison. Agrand. ± 140 fois.

la conséquence du croisement d'espèces. Fig. 10 représente quelques grains aussi bien des stériles que des fertiles de l'hybride d'espèces; fig. 11 quelques unes de sa mutation. Ce pollen a été dessiné quand les fleurs venaient de s'ouvrir. Les fig. 12 et 13 représentent le pollen des mêmes variétés, d'autres fleurs, quand celles-ci étaient presque fanées. Si l'on compare les fig. 10 et 11 et ensuite les fig. 12 et 13 on aperçoit une différence nette de dimension.

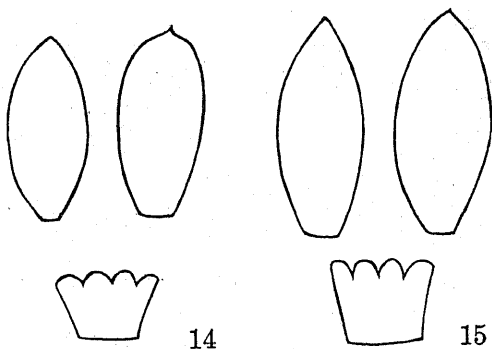


Fig. 14. L'Hybride d'espèces; une tépale du cycle intérieur (à gauche) et une tépale du cycle extérieur (à droite) avec la partie annexe de la corona. Dimension naturelle. Fig. 15. Mutation somatique; comme la fig. 14.

En comparant les fig. 10 et 12 et ensuite les fig. 11 et 13 on voit que le pollen n'a pas beaucoup grandi pendant la floraison.

Les fig. 14 et 15 nous montrent une comparaison entre deux tépales (une du cycle intérieur et une du cycle extérieur) et le segment de la corona qui se trouve à l'intérieur. La différence de dimensions est de nouveau manifeste.

Hybride d'espèces:

tépale intérieure 49 mm de longueur, 21 mm de largeur;
tépale extérieure 51 mm de longueur, 23 mm de largeur;
hauteur de la corona 18 mm.

Mutation somatique:

tépale intérieure 58 mm de longueur, 23 mm de largeur;
tépale extérieure 60 mm de longueur, 23 mm de largeur;
hauteur de la corona 22 mm.

Le contrôle du nombre de graines et du nombre de cellules des coupes de racines nous a appris que l'augmentation de dimensions des anthères et des racines doit être attribuée principalement, pour ne pas dire complètement, à l'augmentation de la dimension des cellules. Ici le nombre cellulaire est probablement resté le même.

Au moment où cette publication est terminée, mi-juillet 1936, les bulbes viennent d'être arrachées. Un contrôle minutieux montre qu'il n'y a pas ou presque pas de différence de dimension.

D'une manière très convaincante des hybridations avec les formes commentées dans l'entreprise d'amélioration à Lisse ont montré combien grande la valeur pratique peut être d'une augmentation du nombre chromosomique etc. Pendant des années les deux variétés ont été croisées avec les mêmes hybrides de *Narcissus*. Puisqu'on a obtenue de la bonne semence, on voit qu'elles produisent bien des macro- et microgamètes fertiles et de bonne espèce.

En général on est obligé de sélectionner très étroitement afin d'obtenir des variétés appropriées au commerce qui peuvent soutenir une concurrence avec l'assortiment actuel. Or, il paraît, que de beaucoup de croisements avec les formes en question il n'est resté que:

No 421 – croisement 1931: mutation somatique ♀ × variété Gigantic Orchid flower ♂.

No 472 – croisement 1933: mutation somatique ♀ × variété Gigantic Orchid flower ♂.

(Résumé Liste des plantes 1935–1936). Gigantic Orchid flower représente une section de variétés hétéropléides de *N. pseudo-narcissus* obtenue par l'auteur où la paracorolla est divisée en 6 segments, cf. 1923d; 1932a et b; 1934a; 1936.

Les descendants ci-dessus désignés ont donc donné la preuve qu'ils sont dignes d'être cultivés pour la pratique, du moins pour le moment. Les croisements avec l'hybride d'espèce ordinaire étaient donc surpassés par ceux-là avec sa mutation somatique à la duplication du nombre chromosomique et du nombre nucléolair. La cause en est en premier lieu aux dimensions plus grandes et à la rigidité plus forte, ce à quoi tend la pratique. L'augmentation de dimensions est souvent accompagnée d'une coloration plus intense en jaune et en orange, mais pas toujours.

Une publication récente de Fernandes (1936) mentionne la présence de mixoploïdie dans les racines de *N. reflexus*. A côté de noyaux diploïdes ($2x = 14$) on trouvait toujours des cellules et des complexes de cellules avec des noyaux qui contenaient une duplication du nombre chromosomique ($4x = 28$). Ce même exemple de mixoploïdie a été trouvé par l'auteur, il y a bien des années, dans la racine d'une variété cultivée de *N. poeticus*. En même temps Fernandes a distinctement vu que le nombre nucléolair a augmenté. Cet auteur a trouvé aussi une racine qui était entièrement tétraploïde.

A la page 37 il écrit: "Si la duplication avait lieu dans le primorde du bourgeon floral, on pourrait voir apparaître des hampes florales avec des fleurs susceptibles d'engendrer des graines triploïdes et tétraploïdes". Comme suite à ceci on peut dire que ce phénomène a eu lieu chez l'hybride d'espèces ici-dessus traité. Fernandes suppose que la cause principale de l'engendrement des formes polyploïdes doit être attribuée à la formation de gamètes diploïdes, etc. par suite d'une division méiotique irrégulière. L'auteur a adopté exactement la même opinion. Cf. 1922b, où des variétés polyploïdes de *Narcissus* ont été mentionnées; ensuite 1928e, f et 1932a, b, où il a été question de produire de graines diploïdes (et tétraploïdes).

Les mutations végétatives tétraploïdes de formes diploïdes se trouveront-elles plus souvent chez des hybrides d'espèces que des hybrides de variétés? L'unique réponse, bien incomplète d'ailleurs, à cette question significative, est que l'auteur ne les a jamais trouvées chez des hybrides de variétés, mais exclusivement chez des hybrides d'espèces, et cela après une expérience de 28 ans.

Résumé

Il y a des années par une mutation somatique d'un hybride de *Narcissus pseudonarcissus* et *N. poeticus* une forme plus grande est née qui est restée toujours constante.

On a constaté que l'hybride d'espèces est diploïde ($x + x' = 14$)

et que sa mutation végétative est tétraploïde ou di-diploïde ($2x + 2x' = 28$).

La duplication du nombre chromosomique s'est jointe à la duplication du nombre de nucléoles; pour l'hybride d'espèces le plus grand nombre est 2, pour sa mutation somatique il monte à 4.

L'augmentation de dimension des plantes est en premier lieu en rapport avec l'accroissement des cellules.

Les expériences d'amélioration ont montré que la mutation somatique représente une plus grande valeur pour la pratique que l'hybride d'espèces.

Cet exemple a montré d'une façon évidente l'importance de la duplication du nombre chromosomique pour les cultures pratiques.

Littérature

Pour les exposés de l'auteur parus avant l'année 1934 voir les listes de Littérature ajoutées à sa première (1933, Bd. 5, no 1, p. 63-65) et seconde (1934, Bd. 5, no 2, p. 229) publication dans „Cytologia.“

Fernandes, A., 1936. La mixoploidie chez *Narcissus Reflexus* Brot. Boletim da Sociedade Broteriana, 11, 2 Série, p. 27-42.

De Mol, W. E., 1934. The origin of double *Daffodils*. R. H. S. Daffodil Year-Book, London, p. 38-44.

1936. Über eine neue „Schizocoronata“-Form von *Narcissus*. Der Züchter, 8, p. 70-75.
